

Our Ref.: 249-202  
K46-131990C/EK

# ***U.S. PATENT APPLICATION***

***Inventor(s):***

Yutaka KANDA  
Mitsuo SATOH  
Kazuyasu NAKAMURA  
Kazuhisa UCHIDA  
Toyohide SHINKAWA  
Naoko YAMANE  
Emi HOSAKA  
Kazuya YAMANO

Motoo YAMASAKI  
Nobuo HANAI

***Invention:***

ANTIBODY COMPOSITION-PRODUCING CELL

***NIXON & VANDERHYE P.C.  
ATTORNEYS AT LAW  
1100 NORTH GLEBE ROAD  
8<sup>TH</sup> FLOOR  
ARLINGTON, VIRGINIA 22201-4714  
(703) 816-4000  
Facsimile (703) 816-4100***

## ***SPECIFICATION***

# ANTIBODY COMPOSITION-PRODUCING CELL

## BACKGROUND OF THE INVENTION

### 1. Field of the Invention

本発明は、種々の疾患に有用な抗体、抗体の断片、抗体の Fc 領域を有する融合タンパク質などの抗体分子の製造に用いる細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、およびその用途に関する。

### 2. Brief Description of the Background Art

抗体は、高い結合活性、結合特異性及び血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療への応用が試みられてきた [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域 (以下、CDR と表記する) 移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域 (以下、V 領域と表記する) がヒト以外の動物の抗体で、定常領域 (以下、C 領域と表記する) がヒト抗体である抗体である。ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト抗体の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR と置換した抗体である。

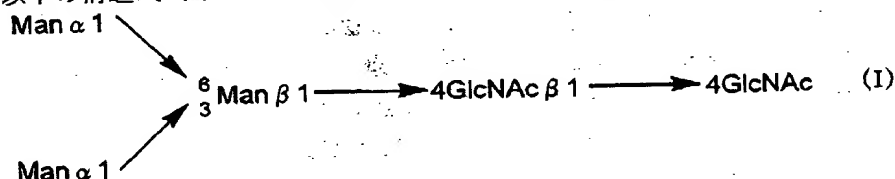
哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgE の 5 種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒト IgG クラスの抗体が主として利用されている [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)]。ヒト IgG クラスの抗体は、更に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の 4 種類のサブクラスに分類されている。IgG クラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性 (以下、ADCC 活性と表記する) や補体依存性細胞障害活性 (以下、CDC 活性と表記する) については、これまでに多数の研究が行われ、ヒト IgG クラスでは、IgG1 サブクラスの抗体が最も高い ADCC 活性、CDC 活性を有していることが報告されている [Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]。以上の観点から、市販のリツキサン、ハーセプチンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒト IgG1 サブクラスの抗体である。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体の ADCC 活性及び CDC 活性の発現には、抗体 Fc 領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター (以下、FcγR と表記する) 及び各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域及び C 領域の第 2 番目のドメイン (以下、Cγ2 ドメインと表記する) 内のいくつかのアミノ酸残基の重要性 [Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993)、Immunology, 86, 319 (1995)、Chemical Immunology, 65, 88 (1997)] の他、Cγ2 ドメインに結合している糖鎖の重要性 [Chemical Immunology, 65, 88 (1997)] が示唆されている。

糖鎖に関しては、Boyd らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) 或いはマウスミエローマ NSO 細胞 (NSO 細胞) で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H (ヒト IgG1 サ

ブクラス) を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖の ADCC 活性、CDC 活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することで CDC 活性のみが影響を受け、約 50% 程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した [Molecular Immunol., 32, 1311 (1995)]。また、Lifely らは、CHO 細胞、NS0 細胞或いはラットミエローマ Y0 細胞で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H (ヒト IgG1 サブクラス) の糖鎖の分析及び ADCC 活性を測定した結果、Y0 細胞由来の CAMPATH-1H が最も高い ADCC 活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミン (以下、GlcNAc と表記する) が重要であることを示唆した [Glycobiology, 5, 813 (1995): W099/54342]。これらの報告は、ヒト IgG1 サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとは言い難い。

糖タンパク質の糖鎖は、タンパク質部分との結合様式により、アスパラギンと結合する糖鎖 (N-グリコシド結合糖鎖) とセリン、スレオニンなどと結合する糖鎖 (O-グリコシル結合糖鎖) の 2 種類に大別される。N-グリコシド結合糖鎖は、様々な構造を有しているが [生物化学実験法 23-糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989 年)]、いずれの場合も以下の構造式 (I) に示す基本となる共通のコア構造を有することが知られている。



アスパラギンと結合する糖鎖の末端が還元末端、反対側が非還元末端と呼ばれている。N-グリコシド結合糖鎖には、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン (以下、Gal-GlcNAc と表記する) の枝を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあることが知られている。

抗体 IgG 分子の Fc 領域には、2 個所の N-グリコシド型の糖鎖結合部位が存在しており、血清中の IgG では、通常、この部位に、シアル酸やバイセクティングの N-アセチルグルコサミンの付加の程度が少ない複数本の枝を持つコンプレックス型糖鎖が結合している。このコンプレックス型糖鎖の非還元末端でのガラクトースの付加および還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られている [Biochemistry, 36, 130 (1997)]。

このような糖鎖の構造は、糖鎖遺伝子、すなわち、糖鎖を合成する糖転移酵素と糖鎖を分解する糖分解酵素の遺伝子によって規定されていると考えられている。

以下に、N-グリコシド結合糖鎖の生合成に関して述べる。

糖タンパク質は、小胞体（以下、ERと表記する）内腔で糖鎖の修飾を受ける。N-グリコシド結合糖鎖の生合成過程では、比較的大きな糖鎖が、ER内腔で伸長しつつあるポリペプチド鎖に転移される。この際、糖鎖はまず、ドリコールリン酸（以下、P-Dolとも表記する）と呼ばれる $\alpha$ -イソブレン単位を20個程度含む長鎖の脂質担体のリン酸基に順次付加される。すなわち、ドリコールリン酸にN-アセチルグルコサミンが転移されGlcNAc-P-P-Dolとなり、続いてもう1個GlcNAcが転移されGlcNAc-GlcNAc-P-P-Dolとなる。次いで、マンノース（以下、Manとも表記する）が5個転移され $(\text{Man})_5-(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$ に、さらに、Manが4個、グルコース（以下、Glcとも表記する）が3個転移される。このようにして、コアオリゴ糖と呼ばれる糖鎖の前駆体 $(\text{Glc})_3-(\text{Man})_9-(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$ ができる。この14個の糖からなる糖鎖の前駆体はアスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-スレオニン配列を持ったポリペプチドへER内腔でひとかたまりのまま転移される。この際、コアオリゴ糖に結合していたドリコールピロリン酸（P-P-Dol）は遊離するが、ピロホスファターゼの分解を受けて再びドリコールリン酸となり再利用される。糖鎖のトリミングは、糖鎖がポリペプチドに結合すると直ちに開始される。すなわち、3個のGlcと1ないし2個のManがER上で除去され、この除去には $\alpha$ -1,2-グルコシダーゼI、 $\alpha$ -1,3-グルコシダーゼIIおよび $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼが関与することが知られている。

ER上でトリミングを受けた糖タンパク質はゴルジ体へ輸送され様々な修飾を受ける。ゴルジ体シス部には、マンノースリン酸を付加するN-アセチルグルコサミンホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホジエステル $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼおよび $\alpha$ -マンノシダーゼIが存在し、Man残基を5個にまで減少させる。ゴルジ体メディア部には、コンプレックス型のN-グリコシド結合糖鎖の最初の外側のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素I（GnII）、2個のManを除去する $\alpha$ -マンノシダーゼII、外側から2個目のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素II（GnIII）、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースを付加する $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが存在する。ゴルジ体トランス部にはガラクトースを付加するガラクトース転移酵素、N-アセチルノイラミン酸などのシアル酸を付加するシアル酸転移酵素が存在する。このような各種酵素の作用を受けてN-グリコシド結合糖鎖が作られることが知られている。

一般的に、医薬への応用が考えられているヒト化抗体の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞を宿主細胞として用い製造されているが、上述したように、抗体のエフェクター機能には糖鎖構造が極めて重要な役割を担っていること、宿主細胞によって発現された糖タンパク質の糖鎖構造に違いが観察されることから、より高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能な宿主細胞の開発が望まれている。

生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、1) 糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤の応用、2) 突然変異体の選択、3) 糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の導入などの方法が試みられている。以下に、それら具体的例を述べる。

糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤としては、N-グリコシド結合糖鎖の前駆体であるコアオリゴ糖形成の最初のステップであるGlcNAc-P-P-Dolの形成を選択的に阻害するツニカマイシン、グリコシダーゼIの阻害剤であるカスチノスベルミンやN-メチル-1-デオキシノジリ



マイシン、グルコシダーゼ II の阻害剤であるプロモコンヅリトール、マンノシダーゼ I の阻害剤である 1-デオキシノジリマイシンや 1,4-ジオキシ-1,4-イミノ-D-マンニトール、マンノシダーゼ II の阻害剤であるスワンソニンなどが知られている。糖転移酵素の特異的な阻害剤としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnTV) などに対する基質のデオキシ誘導体が知られている [グライコバイオロジーシリーズ 2—糖鎖の細胞における運命 (講談社サンエンティフィック) 永井克幸・箱守仙一朗・木幡陽編 (1993)]。また、1-デオキシノジリマイシンはコンプレックス型糖鎖の合成を抑え、ハイマンノース型やハイブリッド型糖鎖の割合を増加させることが知られている。実際に、これら阻害剤を培地に添加することで IgG の糖鎖構造が変化し、抗原結合性などが変化することが報告されている [Molecular Immunol., 26, 1113 (1989)]。

糖鎖の修飾に係わる酵素の活性に関する突然変異体は、主に、レクチン耐性株として選択され取得されている。例えば、WGA (*T. vulgaris* 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (*C. ensiformis* 由来の concanavalin A)、RIC (*R. communis* 由来の毒素)、L-PHA (*P. vulgaris* 由来の leukoagglutinin)、LCA (*L. culinaris* 由来の lentil agglutinin)、PSA (*P. sativum* 由来の Pea lectin) などのレクチンを用い、様々な糖鎖構造を有する CHO 細胞変異株がレクチン耐性株として取得されている [Somatic Cell Mol. Genet., 12, 51 (1986)]。

糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を宿主細胞に導入して生産物の糖鎖構造を改変した例としては、ラットの  $\beta$ -ガラクトシド- $\alpha$ -2,6-シアルルトランスフェラーゼを CHO 細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加されたタンパク質の製造が可能であることが報告されている [J. Biol. Chem., 261, 13848 (1989)]。

また、ヒトの  $\beta$ -ガラクトシド-2- $\alpha$ -フコシルトランスフェラーゼをマウス L 細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース (以下、Fuc と表記する) が付加された H 抗原 (Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-) の発現が確認されている [Science, 252, 1668 (1991)]。さらに、Umana らは、N-グリコシド結合糖鎖のバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミンの付加が抗体の ADCC 活性に重要であるとの知見に基づき、 $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnTIII) を発現させた CHO 細胞を作製し親株との比較を行っている。親株の CHO 細胞では GnTIII の発現が観察されておらず [J. Biol. Chem., 261, 13370 (1984)]、作製した GnTIII 発現 CHO 細胞を用いて発現させた抗体は親株で発現させた抗体と比べ 16 倍高い ADCC 活性を有していることを確認している [Glycobiology, 5, 813 (1995): W099/54342]。またこの際、Umana らは、 $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnTV) の遺伝子を導入した CHO 細胞も作製しており、GnTIII または GnTV の過剰発現は CHO 細胞に対して毒性を示すことを報告している。

このように、生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節する試みがなされているが、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、かつ糖鎖が持つ生理的な役割の解明も十分とは言い難いため試行錯誤を繰り返しているのが現状である。特に、抗体のエフェクター機能は糖鎖構造により大きな影響を受ける事が明らかになりつつあるが、真に重要な糖鎖構造の特定には至っていない。従って、抗体のエフェクター機能に影響を及ぼす糖鎖構造の同定と、そのような糖鎖構造の付加が可能な宿主細胞の開発が医薬開発の上で求められている。

## SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、抗体分子の糖鎖構造を制御することが可能な、抗体組成物を生産する宿主細胞、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、該製造方法で製造された抗体組成物を提供することを目的とする。

本発明は、以下の (1)～(61) に関する。

(1) N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞。

(2) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖である、(1) に記載の CHO 細胞。

(3) 抗体分子のクラスが IgG である、(1) または (2) に記載の CHO 細胞。

(4) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した (1)～(3) のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(5) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、(4) に記載の CHO 細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(6) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(7) GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(8) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダ

イズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(9) Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

(10) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(11) GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

(12) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、

(4) に記載の CHO 細胞。

(13)  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(12) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(14)  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(12) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(15) 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、(4) ～ (14) のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

(16) 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(4) ~ (15) のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(17) 親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(4)～(16)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(18) 抗体組成物に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(17)記載のCHO細胞。

(19) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖である、(18) 記載の CHO 細胞。

(20) (1)～(19)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(21) (20) に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(22)・CHO細胞が産生するN-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物。

(23) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した細胞。

(24) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる酵素である、(23)記載の細胞。

- (a) GMD (GDP-mannose 4, 6-dehydratase);  
(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3, 5-epimerase, 4-reductase);  
(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase).

(25) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;  
(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(26) GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24)

に記載の細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(27) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx を有する蛋白質をコードする DNA。

(28) Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

(29) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(30) GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

(31) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(23) に記載の細胞。

(32)  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(31) に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA；

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(33)  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、(31) に記載の細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(34) 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる手法である、(23) ~ (33) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

(35) 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(23) ~ (34) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(36) (23) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の細胞が、下記の (a) ~ (i) からなる群から選ばれる細胞。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞。

(37) (23) ~ (36) のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

(38) 抗体分子のクラスが IgG である、(37) 記載の細胞。

(39) (37) または(38)項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物の製造方法。

(40) 親株から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(39)に記載の方法。

(41) (39) または(40)に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

(42) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(43) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた、(42) 記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(44) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、(42) または(43)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase);

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase);

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(45) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(44) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(46) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(44) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(47) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(44) に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(48) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(42) または(43)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(49)  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(48) に記載のトランスジェニック非ヒト

ト動物あるいは植物、またはその子孫。

- (a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;
- (d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(50) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、(42) ~ (49) のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

(51) (42) ~ (50) のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入し、該動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(52) 抗体分子のクラスが IgG である、(51) に記載の方法。

(53) ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(51) または (52) に記載の方法。

(54) (51) ~ (53) のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

(55) (21)、(22)、(41) または (54) のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(56) 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、(55) に記載の医薬。

(57) 以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i) 及び (j) からなる群から選ばれる蛋白質。

- (a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質 ;
- (c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;
- (e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (f) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質 ;
- (g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (h) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;



- (i) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；  
(j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(58) (57) 記載の蛋白質をコードする DNA。

(59) 以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる DNA。

- (a) 配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA；  
(b) 配列番号 2 で表される塩基配列を含む DNA；  
(c) 配列番号 65 で表される塩基配列を含む DNA；  
(d) 配列番号 48 で表される塩基配列を含む DNA；  
(e) 配列番号 51 で表される塩基配列を含む DNA。

(60) 以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれるゲノム DNA。

- (a) 配列番号 3 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；  
(b) 配列番号 67 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；  
(c) 配列番号 70 で表される塩基配列を含むゲノム DNA。

(61) (58) ～(60) のいずれか 1 項に記載の DNA 全長あるいは一部を含む相同組み換えのためのターゲットベクター。

#### BRIEF EXPLANATION OF THE DRAWINGS

第 1 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の SDS-PAGE (4～15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。1A 図が非還元条件、1B 図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン 1 が高分子量マーカー、2 が YB2/0-GD3 キメラ抗体、3 が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、4 が SP2/0-GD3 キメラ抗体、5 が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、6 が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT)、7 が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 2 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 3 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 4 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の SDS-PAGE (4～15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。4A 図が非還元条件、4B 図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン 1 が高分子量マーカー、2 が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、3 が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、4 が NS0-hIL-5RCDR 抗体、5 が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 5 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の hIL-5R $\alpha$  との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した結果を示した図である。縦軸は hIL-5R $\alpha$  との結合活性、横軸は抗体濃

度をそれぞれ示す。○が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、●が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、□が NS0-hIL-5RCDR 抗体の活性をそれぞれ示す。

第 6 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の hIL-5 発現マウス T 細胞株 CTLL-2 (h5R) に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、●が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、□が NS0-hIL-5RCDR 抗体の活性をそれぞれ示す。

第 7 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体のカニクイザルの hIL-5 誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を示した図である。縦軸に末梢血中好酸球数、横軸に日数（抗体及び hIL-5 の投与開始日を 0 日とした）をそれぞれ示す。101、102 が抗体非投与群、301、302、303 が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体投与群、401、402、403 が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体投与群、501、502、503 が NS0-hIL-5RCDR 抗体投与群の結果をそれぞれ示す。

第 8 図は、YB2/0 が生産した精製抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体（8A 図）および NS0 が生産した精製抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体（8B 図）の PA 化糖鎖の逆相 HPLC 分離の分離図（左図）とその PA 化糖鎖を  $\alpha$ -L-フコシダーゼ処理した後に逆相 HPLC で分析して得た分離図（右図）を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 9 図は、CHO/d 細胞が生産した精製抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体から PA 化糖鎖を調製し、逆相 HPLC で分析して得た分離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 10 図で、10A 図は、非吸着画分、吸着画分の一部の GD3 との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。10B 図は非吸着画分、吸着画分の一部のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。

第 11 図は、非吸着画分、吸着画分の一部から調製した PA 化糖鎖を逆相 HPLC で分析して得た分離図を示した図である。11A 図に非吸着画分の分離図、11B 図に吸着画分の一部の分離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 12 図は、6 種類の抗 GD3 キメラ抗体（12A 図～12F 図）から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た分離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 13 図は、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体（50%）、□が抗 GD3 キメラ抗体（45%）、■が抗 GD3 キメラ抗体（29%）、△が抗 GD3 キメラ抗体（24%）、▲が抗 GD3 キメラ抗体（13%）、×が抗 GD3 キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

第 14 図は、ドナー A のエフェクター細胞を用いた、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体（50%）、□が抗 GD3 キメラ抗体（45%）、■が抗 GD3 キメラ抗体（29%）、△が抗 GD3 キメラ抗体（24%）、▲が抗 GD3 キメラ抗体（13%）、×が抗 GD3 キメラ抗体（7%）の活性

をそれぞれ示す。

第 15 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 16 図は、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た分離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 17 図は、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は CCR4 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 18 図は、ドナーA のエフェクター細胞を用いた、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。また、18A 図はドナーA、18 図はドナーB のエフェクター細胞を用いた結果を示す。

第 19 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 20 図は、プラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 21 図は、プラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS の構築を示した図である。

第 22 図は、プラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 23 図は、プラスミド CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS の構築を示した図である。

第 24 図は、競合的 RT-PCR 法を用いた各宿主細胞株における FUT8 転写産物量の定量結果を示した図である。ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を示す。■が CHO 細胞株、□が YB2/O 細胞株を宿主細胞として用いた結果をそれぞれ示す。

第 25 図は、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 26 図は、プラスミド pBSmfFUT8 の構築を示した図である。

第 27 図は、プラスミド pAGEmfFUT8 の構築を示した図である。

第 28 図は、競合的 RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子過剰発現株の該遺伝子発現量解析結果を示した図である。縦軸に  $\beta$ -アクチン転写量に対する FUT8 転写量の相対値を示す。

第 29 図は、FUT8 遺伝子過剰発現株より精製した抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞

株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 30 図は、mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。30A 図に mfFUT8-6 株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖、30B 図に pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 31 図は、Herceptin から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 32 図は、プラスミド CHfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 33 図は、プラスミド ploxPPuro の構築を示した図である。

第 34 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-1 の構築を示した図である。

第 35 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-2 の構築を示した図である。

第 36 図は、プラスミド pscFUT8gE2-3 の構築を示した図である。

第 37 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-3 の構築を示した図である。

第 38 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-4 の構築を示した図である。

第 39 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-5 の構築を示した図である。

第 40 図は、プラスミド pKOFUT8Puro の構築を示した図である。

第 41 図は、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ 遺伝子破壊 CHO 細胞株である 1st.  $\Delta$  FUT8 2-46-1 株及び 1st.  $\Delta$  FUT8 2-46 株のゲノムサザン解析結果を示した図である。

第 42 図は、FUT8 対立遺伝子破壊株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。▲、■はそれぞれ、抗 CCR4 キメラ抗体産生 CHO 細胞 5-03 株由来の精製抗体および 1st.  $\Delta$  FUT8 2-46-1 株由来の精製抗体の活性をそれぞれ示す。

第 43 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は 5-03 株、■は CHO/CCR4-LCA 株、◆は CHO/CCR4-AAL 株、▲は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 44 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示したものである。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は YB2/0 株 (KM2760#58-35-16)、△は 5-03 株、●は CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 45 図は、精製した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。45A 図は 5-03 株が生産する抗体、45B 図は CHO/CCR4-LCA 株が生産する抗体、45C 図は CHO/CCR4-AAL 株が生産する抗体、および 45D 図は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の分析結果を示す。

第 46 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築 (全 6 工程) の第 1 の工程を示した図である。

第 47 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 2 の工程を示した図である。

第 48 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 3 の工程を示した図である。

第 49 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 4 の工程を示した図である。

第 50 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 5 の工程を示した図である。

第 51 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 6 の工程を示した図である。

第 52 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示した図である。LCA レクチンを添加せずに培養した細胞群の生存率を 100%とし、2 回測定を行った図である。図中 249 は、発現ベクター pAGE249 を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する生存率を示す。GMD は GMD 発現ベクター pAGE249GMD を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示す。

第 53 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の細胞群が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 54 図は、CHO 細胞由来の GMD cDNA クローン 22-8 の 5' 末端にクローン 34-2 の 5' 末端を導入したプラスミド CHO-GMD の作製工程を示した図である。

第 55 図は、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

本発明の抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞であればいかなる CHO 細胞も包含される。

本発明において、抗体分子とは、抗体の Fc 領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Fc 領域を含む融合タンパク質などをあげることができる。

抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。抗体としては動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得された B 細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、重鎖は H 鎖として HV または VH とも称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL とも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CH とも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CL とも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列を任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型 CDR 移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラ

リーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることにヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することもできる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等があげられる。

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、抗体のクラスがIgGのヒト抗体が好ましい。

抗体の断片とは、上記抗体のFc領域を含んだ断片を意味する。抗体の断片としては、H鎖の単量体、H鎖の2量体などがあげられる。

Fc領域を含む融合タンパク質とは、抗体のFc領域を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどのタンパク質とを融合させた物質を意味する。

本発明において、抗体分子のFc領域に結合する糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖が挙げられ、そのN-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトースーN-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型（複合型）をあげることができる。

抗体分子のFc領域には、後述するN-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ1カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。抗体に結合するN-グリコシド結合糖鎖としては、前記構造式(I)で示されるコア構造を有するいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する2本のN-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、Fc領域に結合した糖鎖構造の観点から物質の同一性を判断することができる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物（以下、本発明の抗体組成物と称する）とは、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する糖鎖から構成されていてもよい。

本発明において、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割

合とは、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全ての N-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、該フコースが、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンに  $\alpha$  結合していない糖鎖を意味する。具体的には、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖があげられる。

本発明の抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは 20% 以上、より好ましくは 25% 以上、さらに好ましくは 30% 以上、特に好ましくは 40% 以上、最も好ましくは 50% 以上である抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。抗体濃度が低下すれば、それに伴って ADCC 活性が低下するが、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20% 以上の場合、抗体濃度が低くても高い ADCC 活性を獲得することができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法 23—糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989)]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖を HPAED-PAD 法[J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)]によって分析することによっても決定することができる。

本発明において、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞とは、チャイニーズハムスター (Chinese hamster; *Cricetulus griseus*) の卵巣組織から樹立された株化細胞であればいかなる細胞も包含される。その具体的な例としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (p883-900)等の文献に記載されている CHO 細胞をあげることができる。また、ATCC (The American Type Culture Collection) に登録されている CHO-K1 株 (ATCC CCL-61)、DUXB11 株 (ATCC CRL-9096)、Pro-5 株 (ATCC CRL-1781) や、市販の CHO-S 株 (Lifetechnologies 社 Cat#11619)、あるいはこれら株を様々な培地に馴化させた亜株なども具体的な例としてあげることができる。

本発明において、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素とは、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に係わる酵素とは、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素のことを意味する。

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースは、de novo の合成経路あるいは Salvage 合成経路



[illegible]

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの Salvage 合成経路に關与する酵素としては、具体的には、GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase (GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスホリラーゼ；以下、GFPP と表記する)、Fucokinase (フコキナーゼ) などがあげられる。

本発明において、GMDとしては、

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA

または、

(d) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質

等があげられる。

本発明において、Fxとしては、

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA

または、

(d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質

- 20-

等があげられる。

また、Fx のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 48 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 48 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、GFPP としては、

下記(a)または(b)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質

(e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、GFPP のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 51 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 51 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に影響を与える酵素を意味する。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼや  $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

また、上述の N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

本発明において、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、

下記(a)、(b)、(c)または(d)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダ

イズし、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA または、

- (e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質
  - (f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質
  - (g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
  - (h) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
  - (i) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
  - (j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質
- 等があげられる。

また、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 1 または 2 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 1 または 2 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば配列番号 1、2、48、51 または 65 で表される塩基配列を有する DNA などの DNA またはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0M の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号 1、2、48、51 または 65 で表される塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有する DNA、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

本発明において、配列番号 23、24、71、72 または 73 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ

α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性または GFPP 活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号1、2、65、48または51で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

また、本発明において、用いられる蛋白質が、α-1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性または GFPP 活性を有するためには、それぞれ配列番号23、24、71、72または73で表されるアミノ酸配列とBLAST[J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]やFASTA[Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)]等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。本発明のCHO細胞としては、上述の酵素活性が低下または欠失した細胞があげられる。

上述の酵素活性が低下または欠失した細胞としては、すなわち、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株より低下または欠失した細胞を包含する。このような細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下または欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または欠失させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
  - (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
  - (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
  - (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
  - (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法
- などがあげられる。

ここで、レクチンに耐性である株は、ある一定濃度のレクチンを含む培地中で培養した場合に、親株に比べて統計的な有意差を伴って少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは5倍以上生存率に差が生じる性質を獲得する株を選択することで取得することができる。また、レクチンを含む培地中で培養した場合に、ある一定の生存率、例えば80%の生存率、で培養可能なレクチンの濃度が、親株に比べ少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20倍以上の濃度となる株を選択することでも取得することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位がα結

合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (*Lens Culinaris* 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (*Pisum sativum* 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (*Vicia faba* 由来の Agglutinin)、ヒヨロチャワンタケレクチン AAL (*Aleuria aurantia* 由来の Lectin) 等をあげることができる。

本発明の CHO 細胞は、上記の目的とする酵素活性を低下または欠失させる手法を施す前の親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することができる。

また、本発明の CHO 細胞は、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%未満である抗体組成物よりも ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することができる。

本発明において親株としては、例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下していない細胞があげられる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を低下または欠失させるような処理を施していない細胞が用いられる。

本発明において、ADCC 活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体 Fc 領域とエフェクター細胞表面上に存在する Fc レセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性を意味する [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等があげられる。

本発明は、また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合等鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖修飾に関与する酵素の活性が、遺伝子工学的な手法により低下した細胞（以下、本発明の宿主細胞と略記する）に関する。本発明の宿主細胞は、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産するための宿主細胞として有用である。

本発明の宿主細胞としては、抗体分子を発現できる宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。その例として、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞の具体的な例としては、後述の 3. に記載のものがあげられる。特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞、ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞、マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞、マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

以下、本発明を詳細に説明する。

## 1. 本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

### (1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNA または RNA を含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RDO 法、RNAi 法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

#### (a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239 (1993)、BIO/TECHNOLOGY, 17, 1097 (1999)、Hum. Mol. Genet., 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1886 (1999)等に記載されたりボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製したあるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA 部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

本発明の宿主細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3. に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

#### 形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコルシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコル, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)]、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析や RT-PCR 法等があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 5 または後述の 6 に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合

[illegible]

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全 RNA 又は mRNA を調製する。  
調製した全 RNA 又は mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA を取得することができる。

また、全 RNA から poly (A)<sup>+</sup> RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等があげられる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞 mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。cDNA ライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies 社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社)を用いる方法などがあげられる。

- 27 -



λgt10、λgt11 [DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (Clontech 社)、λExCell (Pharmacia 社)、pT7T318U (Pharmacia 社)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] および pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、Strategies, 5, 81 (1992)]、*Escherichia coli* C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、*Escherichia coli* Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、*Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] および *Escherichia coli* JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

この cDNA ライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げ、なるべく完全長 cDNA を効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171 (1994); Gene, 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNA クローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製した cDNA ライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 端および 3' 端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば Sanger らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377 DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片を DNA をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の DNA を取得することができる。

また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖

修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いてスクリーニングを行うことにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の DNA を取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする DNA の塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば Sanger らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377 DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定する。

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 48、51 または 65 に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1 または 2 に記載の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

#### ゲノム DNA の調製方法

ゲノム DNA を調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を単離することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 67 または 70 に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 3 に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5～150 塩基、好ましくは 5～60 塩基、より好ましくは 10～40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴ RNA および該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンが phenoxazine-modified cytosine で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

#### (b) 相同組換え法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換

え法を用い改変することによって作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, S. cond Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「E S細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する。

ゲノム DNA の塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3. に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、上記1の(1)の(a)に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 67 または 70 に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 3 に記載の塩基配列があげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995) 等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の3. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)やPCR法[PCR Protocols, Academic Press (1990)]等があげられる。

#### (c) RDO 方法による本発明の細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO (RNA-DNA oligonucleotide) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さの RDO のコンストラクトを設計し合成する。

合成した RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞への RDO の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (a) に記載の「DNA の調製方法」などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) の (a) に記

載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

DNA の塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNA シークエンサー (Pharmacia 社製) 等を用いて解析することで該 DNA の塩基配列を決定することができる。

RDO は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記 1 の (1) の (a) に記載の、導入した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述の 1 の (5) に記載の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述の 5 または後述の 6 に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RDO のコンストラクトは、Science, 273, 1386 (1996); Nature Medicine, 4, 285 (1998); Hepatology, 25, 1462 (1997); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); J. Mol. Med., 75, 829 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8774 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8768 (1999); Nuc. Acids. Res., 27, 1323 (1999); Invest. Dermatol., 111, 1172 (1998); Nature Biotech., 16, 1343 (1998); Nature Biotech., 18, 43 (2000); Nature Biotech., 18, 555 (2000) 等の記載に従って設計することができる。

#### (d) RNAi 方法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi (RNA interference) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する。

調製した cDNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を

含む適当な長さの RNAi 遺伝子のコンストラクトを設計する。

該 RNAi 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入した細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、設計した RNAi 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3. に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 5 または後述の 6 に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載された DNA の調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計した RNAi 遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

RNAi 遺伝子は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

RNAi 遺伝子のコンストラクトは、[Nature, 391, 806 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502 (1998); Nature, 395, 854 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049 (1999); Cell, 95, 1017 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451 (1999);

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959 (1998); Nature Cell Biol., 2, 70 (2000)]等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、Nature Genet., 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子を突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞の DNA に変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の 5 または後述の 6 に記載の方法があげられる。

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげ



られる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMD を例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来の GMD の立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸（133 番目のトレオニン、135 番目のグルタミン酸、157 番目のチロシン、161 番目のリシン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている（Structure, 8, 2, 2000）。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら 4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMD の補酵素 NADP や基質である GDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMD の酵素活性を担うこれら 4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来の GMD の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO 細胞由来の GMD（配列番号 65）では、155 番目のトレオニン、157 番目のグルタミン酸、179 番目のチロシン、183 番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を用い、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長 DNA をもとにして、必要に応じて、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 DNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構

造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3. に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 5 または後述の 6 に記載の方法があげられる。

### (3) 酵素についての突然変異を導入する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞の DNA に点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版（朝倉書店）日本組織培養学会編（1996）、Nature Genet., 24, 314, (2000)等に記載の方法をあげることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体をあげることができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、前記 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の 5 または後述の 6 に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) に記載の方法があげられる。

#### (4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンス RNA/DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

#### (5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、Somatic Cell Mol. Genet., 12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (*Lens Culinaris* 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (*Pisum sativum* 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (*Vicia faba* 由来の Agglutinin)、ヒヨロチャワンタケレクチン AAL (*Aleuria aurantia* 由来の Lectin) 等をあげることができる。

具体的には、 $1 \mu\text{g/ml} \sim 1\text{mg/ml}$  の濃度の上述のレクチンを含む培地で 1 日～2 週間、好ましくは 1 日～1 週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明の N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。上記方法で得られる株としては、例えば、後述の実施例 14(2) で取得した CHO/CCR4-LCA 株 Nega-13 (FERM BP-7756) があげられる。

## 2. 本発明の、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製

本発明の、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、抗体分子の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的として、1. に記載の手法と同様の手法を用いて作製することができる。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製することができる。

具体的には、染色体上の細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法 [例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987) 等] により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞 (blastocyst) への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、

ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明の受精卵細胞を作製することができる。

作製した受精卵細胞を、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルス又は細胞に、1. に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位あるいは3位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明のカルスを作製することができる。

作製したカルスを、公知の方法[組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)]に準じてオーキシン及びサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位あるいは3位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック植物を作製することができる。

### 3. 抗体組成物の製造方法

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (以下、アンチボディーズとも略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993 (以下、モノクローナルアンチボディーズとも略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 (以下、アンチボディエンジニアリングとも略す)等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

抗体分子の全長 cDNA を調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素を、遺伝子工学的

な手法を用いて導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNA は、上記 1 の (1) の (a) に記載の DNA の調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソーススキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスボロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius* 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 [特開平 2-227075]、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen 社)、pREP4 (Invitrogen 社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$  プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞である Namalwa 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用

[illegible]

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスである *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば *Agrobacterium* を用いる方法 [特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭 60-251887]、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法 [日本特許第 2606856、日本特許第 2517813] 等をあげることができる。

- 42-

を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15〜40℃がよく、培養時間は、通常16時間〜7日間である。培養中のpHは3.0〜9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性的プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、i 9 9 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]、Whitten 培地 [発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方 (講談社) 勝木元也編 (1987)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。



培養は、通常 pH 6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社)、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、White 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平 5-336963、特開平 6-823021 等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードする DNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子で発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体 (トランスジェニック非ヒト動物) または植物個体 (トランスジェニック植物) を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996); American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996); Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク (特開昭 63-309192)、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである  $\alpha$  カゼインプロモーター、 $\beta$  カゼインプロモーター、 $\beta$  ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック植物を公知の方法 [組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia 社) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理する

ことにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体の Fc 領域を有する融合タンパク質などをあげることができる。

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

#### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の重鎖 (H鎖) 及び軽鎖 (L鎖) C 領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域としては、任意のヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域 (以下、hC $\gamma$ 1 と表記する) 及びヒト抗体の L 鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域 (以下、hC $\kappa$  と表記する) 等があげられる。

ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖及び L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (以下、タンデム型と表記する) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖及び L 鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

#### (2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングして cDNA ライブラ

リーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体の C 領域部分或いは V 領域部分をプローブとして用い、H 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の全塩基配列を決定し、塩基配列より H 鎖及び L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成及び cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (モレキュラー・クローニング第 2 版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34)、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λ zap II (Stratagene 社製)、λ gt10、λ gt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λ ExCell1、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] 及び JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR 法と表記する; モレキュラー・クローニング第 2 版; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34] により H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA

を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNA シークエンサー (Pharmacia 社製) 等を用いて解析することで該 cDNA の塩基配列を決定することができる。決定した塩基配列から H 鎖及び L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

(3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析  
分泌シグナル配列を含む抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及び N 末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H 鎖及び L 鎖 V 領域の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することによって見出すことができる。

#### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項 3 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖及び L 鎖 V 領域の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域の 5' 末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを本項 3 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の CDR を移植するヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のフレームワーク (以下、FR と表記する) のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank 等

のデータベースに登録されているヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖の V 領域の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも 60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さから成る数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率及び合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 3 の (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 後、増幅産物を pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、本項 3 の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を有するプラスミドを取得する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

本項 3 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子の上流に、本項 3 の (5) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項 3 の (5) でヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 3 の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (7) ヒト化抗体の安定的生産

本項 3 の (4) 及び (6) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体（以下、併せてヒト化抗体と称す）を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891; Cytotechnology, 3, 133 (1990)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることがで

きる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr<sup>-</sup>細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、5 に記載本発明の宿主細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418 と表記する; SIGMA 社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日本製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FBS と表記する) 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [以下、ELISA 法と表記する; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1998)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)]。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGE と表記する; Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、前記 1. に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

#### 4. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいはエフェクター機能はを測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等

に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は ELISA 法及び蛍光抗体法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]。

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

## 5. 各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖タンパク質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG 分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

### (1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex 社製糖組成分析装置 (BioLC) を用いる方法があげられる。BioLC は HPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [Agric. Biol. Chem., 55(1), 283-284 (1991)] に従って酸加水分解した試料を 2-アミノピリジンで蛍光ラベル化し、HPLC 分析して組成比を算出することができる。

### (2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、2 次元糖鎖マップ法 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)、生物化学実験法 23-糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989 年)] により行うことができる。2 次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [J. Biochem., 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をも



とに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa 社製)、文献 [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖の MALDI-TOF-MS などの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

#### 6. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上であり、高い ADCC 活性を示す特徴を有している。このような抗体組成物は、上記 6. に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献 [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc. (1995); 酵素免疫測定法, 第 3 版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウェスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzymeimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (*T. vulgaris* 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (*C. ensiformis* 由来の concanavalin A)、RIC (*R. communis* 由来の毒素)、L-PHA (*P. vulgaris* 由来の leucoagglutinin)、LCA (*L. culinaris* 由来の lentil agglutinin)、PSA (*P. sativum* 由来の Pea lectin)、AAL (*Aleuria aurantia* Lectin)、ACL (*Amaranthus caudatus* Lectin)、BPL (*Bauhinia purpurea* Lectin)、DSL (*Datura stramonium* Lectin)、DBA (*Dolichos biflorus* Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (*Erythrina cristagalli* Lectin)、EEL (*Euonymus europaeus* Lectin)、GNL (*Galanthus nivalis* Lectin)、GSL (*Griffonia simplicifolia* Lectin)、HPA (*Helix pomatia* Agglutinin)、HHL (*Hippeastrum Hybrid* Lectin)、Jacalin、LTL (*Lotus tetragonolobus* Lectin)、LEL (*Lycopersicon esculentum* Lectin)、MAL (*Maackia amurensis* Lectin)、MPL (*Maclura pomifera* Lectin)、NPL (*Narcissus pseudonarcissus* Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (*Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin)、PTL (*Psophocarpus tetragonolobus* Lectin)、RCA (*Ricinus communis* Agglutinin)、STL (*Solanum tuberosum* Lectin)、SJA (*Sophora japonica* Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (*Ulex europaeus* Agglutinin)、VVL (*Vicia villosa* Lectin)、WFA (*Wisteria floribunda* Agglutinin) があげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、

レンズマメレクチン LCA (*Lens Culinaris* 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (*Pisum sativum* 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (*Vicia faba* 由来の Agglutinin)、ヒヨコチャワソウタケレクチン AAL (*Aleuria aurantia* 由来の Lectin) をあげることができる。

## 7. 本発明の抗体分子の利用

本発明の抗体組成物は高い抗体依存性細胞障害活性を有する。高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウイルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖する。通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することとを特徴とする。しかし、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [Science, 280, 1197 (1998)]、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それらの疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて抑えることにより、循環器疾患を予防および治療することができる。

ウイルスまたは細菌に感染細胞を、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いてウイルスまたは細菌に感染細胞の増殖を抑えることにより、ウイルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を以下に述べる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 (Ohta et al., Anticancer Res., 13, 331-336, 1993)、抗 GD3 抗体 (Ohta et al., Cancer Immunol. Immunother., 36, 260-266, 1993)、抗 GM2 抗体 (Nakamura et al., Cancer Res., 54, 1511-1516, 1994)、抗 HER2 抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗 CD52 抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992)、抗 MAGE 抗体 (Jungbluth et al., British J. Cancer, 83, 493-497, 2000)、抗 HM1.24 抗体 (Ono et al., Molecular Immunol., 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Ogata et al., Cancer, 88, 2909-2911, 2000)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗 FGF 8 抗体 (Matsuzaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911-9915, 1989)、

抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗 FGF8 受容体抗体 (Kuo et al., J. Biol. Chem., 265, 16455-16463, 1990)、抗インスリン様増殖因子抗体 (Yao et al., J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (Yao et al., J. Neurosci. Res., 40, 647-659, 1995)、抗 PMSA 抗体 (Murphy et al., J. Urology, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Presta et al., Cancer Res., 57, 4593-4599, 1997)、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Kanno et al., Oncogene, 19, 2138-2146, 2000) などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン 6 抗体 (Abrams et al., Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン 6 受容体抗体 (Sato et al., Molecular Immunol., 31, 371-381, 1994)、抗インターロイキン 5 抗体 (Abrams et al., Immunol. Rev., 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体 (Bird et al., Cytokine, 3, 562-567, 1991)、抗インターロイキン 4 受容体抗体 (Jung et al., J. Immunol. Meth., 217, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Tempest et al., Hybridoma, 13, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Amrani et al., Molecular Pharmacol., 58, 237-245, 2000)、抗 CCR4 抗体 (Campbell et al., Nature, 400, 776-780, 1999)、抗ケモカイン抗体 (Peri et al., J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 (Wu et al., J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997) であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗 GpIIb/IIIa 抗体 (Co et al., J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Ferns et al., Science, 253, 1129-1132, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (Shulman et al., J. Biol. Chem., 272, 17400-17404, 1997)、抗血液凝固因子抗体 (Peter et al., Circulation, 101, 1158-1164, 2000) などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 gp120 抗体 (Tugarinov et al., Structure, 8, 385-395, 2000)、抗 CD4 抗体 (Schulze-Koops et al., J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998)、抗 CCR4 抗体、抗ペロ毒素抗体 (Karmali et al., J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999) などがあげられる。

上記抗体は、ATCC (The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所 (現：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター) 等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS 社、PharMingen 社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社からも入手することができる。

本発明の抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg~20mg/kgである。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC 活性測定法、ADCC 活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC 活性、ADCC 活性、抗腫瘍実験は、文献[Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993); Cancer Research, 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 実施例 1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体の作製

##### 1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChiLHGM4 の構築

抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体（以下、抗 GD3 キメラ抗体と表記する）の L 鎖の発現ベクターpChi641LGM4 [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)] を制限酵素 MluI (宝酒造社製) と SalI (宝酒造社製) で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 4.03kb の断片と動物細胞用発現ベクターpAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] を制限酵素 MluI (宝酒造社製) と SalI (宝酒造社製) で切断して得られる G418 耐性遺伝子及びスプライシングシグナルを含む約 3.40kb の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌

HB101 株 (モレキュラー・クローニング第 2 版) を形質転換してプラスミド pChi641LGM40 を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pChi641LGM40 を制限酵素 ClaI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 5.68kb の断片と抗 GD3 キメラ抗体の H 鎖の発現ベクター pChi641HGM4 [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)] を制限酵素 XhoI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる H 鎖 cDNA を含む約 8.40kb の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 HB101 株 (モレキュラー・クローニング第 2 版) を形質転換して抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を構築した。

## 2. 抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

上記実施例 1 の 1 項で構築した抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の  $5\mu\text{g}$  を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 [ATCC CRL-1662, J.V. Kilmarin et al., J. Cell. Biol., 93, 576-582 (1982)] ヘエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、40ml の RPMI1640-FBS(10) [FBS (GIBCO BRL 社製) を 10% 含む RPMI1640 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に  $200\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、DHFR の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTX と表記する; SIGMA 社製) を 50nM 含む RPMI1640-FBS(10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^6$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む RPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択

し用いた。

このようにして得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン 7-9-51 は平成 11 年 4 月 5 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）（現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6））に FERM BP-6691 として寄託されている。

### (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の  $4\mu\text{g}$  を  $1.6 \times 10^6$  細胞の CHO/DG44 細胞[G. Urlaub and L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)] ヘエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-FBS(10) [FBS を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に  $200\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1～2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 10nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地 [透析牛胎児血清（以下、dFBS と表記する；GIBCO BRL 社製）を 10% 含む IMDM 培地] に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート（岩城硝子社製）に 0.5ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 1～2 週間培養して、10nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 100nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

### (3) マウスミエローマ NS0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の  $5\mu\text{g}$  を  $4 \times 10^6$  細胞のマウスミエローマ NS0 細胞ヘエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、40ml の EX-CELL302-FBS(10) [FBS を 10%、L-グルタミン（以下、L-Gln と表記する；GIBCO BRL 社製）を 2mM 含む EX-CELL302 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に  $200\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1～2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR

遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 50nM 含む EX-CELL302-dFBS (10) 培地 (dFBS を 10%、L-Gln を 2mM 含む EX-CELL302 培地) に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む EX-CELL302-dFBS (10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

### 3. 抗体の GD3 に対する結合活性の測定 (ELISA 法)

抗体の GD3 に対する結合活性は以下のようにして測定した。

4nmol の GD3 を 10  $\mu$ g のジパルミトイルフォスファチジルコリン (SIGMA 社製) と 5  $\mu$ g のコレステロール (SIGMA 社製) とを含む 2ml のエタノール溶液に溶解した。該溶液の 20  $\mu$ l (40pmol/ウェルとなる) を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%牛血清アルブミン (以下、BSA と表記する; SIGMA 社製) を含む PBS (以下、1%BSA-PBS と表記する) を 100  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を 50  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05%Tween20 (和光純薬社製) を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1M ケン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を 1  $\mu$ l/ml で添加した溶液 (以下、同様)] を 50  $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) を測定した。

### 4. 抗 GD3 キメラ抗体の精製

#### (1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (1) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを BSA を 0.2%、MTX を 200nM、トリヨードチロニン (以下、T3 と表記する; SIGMA 社製) を 100nM の濃度で含む Hybridoma-SFM 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、2.0L スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 50rpm の速度で攪拌培養した。37°C の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、YB2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

## (2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (2) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 3mM、脂肪酸濃縮液 (以下、CDLC と表記する; GIBCO BRL 社製) を 0.5%、ブルロニック F68 (以下、PF68 と表記する; GIBCO BRL 社製) を 0.3% の濃度で含む EX-CELL302 培地に  $1 \times 10^6$  細胞/ml となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 50ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃ で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、CHO/DG44-GD3 キメラ抗体と名付けた。

## (3) NS0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (3) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 2mM、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM、FBS を 1% の濃度で含む EX-CELL302 培地に  $1 \times 10^6$  細胞/ml となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃ で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と名付けた。

また、該形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/ml となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃ で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) と名付けた。

## (4) SP2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

特開平 5-304989 (EP533199) に記載の抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン (KM-871 (FERM BP-3512)) を G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/ml となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃ で 8 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、SP2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

## 5. 精製した抗 GD3 キメラ抗体の解析

上記実施例 1 の 4 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の各 4μg を公知の方法 [Nature, 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量及び精製度を解析した。その結果を第 1 図に示した。第 1 図に示したように、精製した各抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150 キロダルトン (以下、Kd と表記する) の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下



では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、S-S 結合と表記する）が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] と一致し、各抗 GD3 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

## 実施例 2. 抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

### 1. 抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性 (ELISA 法)

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の GD3（雪印乳業社製）に対する結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。第 2 図は、添加する抗 GD3 キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第 2 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、ほぼ同等の GD3 に対する結合活性を示した。この結果は抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。また、NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の比較から抗原結合活性は、培養に用いる培地にも依らず、一定であることが示唆された。

### 2. 抗 GD3 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性 (ADCC 活性)

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

#### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) の  $1 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 3.7MBq 当量加えて 37℃ で 1 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃ で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

#### (2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $2 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

#### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。

更に、各種抗 GD3 キメラ抗体を各最終濃度 0.0025~2.5  $\mu$ g/ml となるように加え、37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は下式 (II) により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100 \quad (\text{II})$$

その結果を第 3 図に示した。第 3 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のうち、YB2/0-GD3 キメラ抗体が最も高い ADCC 活性を示し、次いで SP2/0-GD3 キメラ抗体、NS0-GD3 キメラ抗体、CHO-GD3 キメラ抗体の順に高い ADCC 活性を示した。培養に用いた培地の異なる NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) では、それらの ADCC 活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体の ADCC 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体の Fc 領域の構造の差に起因していることが推定された。

### 実施例 3. 抗ヒトインターロイキン 5 レセプター $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の作製

#### 1. 抗ヒトインターロイキン 5 レセプター $\alpha$ 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の安定生産細胞の作製

##### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

W097/10354 に記載の抗ヒトインターロイキン 5 レセプター  $\alpha$  鎖ヒト型 CDR 移植抗体 (以下、抗 hIL-5R  $\alpha$  CDR 移植抗体と表記する) の発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 hIL-5R  $\alpha$  CDR 移植抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

抗 hIL-5R  $\alpha$  CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 の 5  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、40ml の RPMI1640-FBS(10) に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 hIL-5R  $\alpha$  CDR 移植抗体の抗原結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 hIL-5R  $\alpha$  CDR 移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 50nM 含む RPMI1640-FBS(10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培

養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の抗原結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む RPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。このようにして得られた抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローン No. 3 は平成 11 年 4 月 5 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）（現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6））に FERM BP-6690 として寄託されている。

## (2) CHO/dhfr-細胞を用いた生産細胞の作製

W097/10354 に記載の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 の 4 $\mu$ g を  $1.6 \times 10^6$  細胞の CHO/dhfr-細胞へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-FBS(10)に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に 200 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の抗原結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 10nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^6$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート（岩城硝子社製）に 0.5ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 1~2 週間培養して、10nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、500nM に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 500nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

## (3) マウスミエローマ NS0 細胞を用いた生産細胞の作製

Yarranton らの方法 [BIO/TECHNOLOGY, 10, 169 (1992)] に従い、W097/10354 に記載の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 上の抗体 H 鎖及び L 鎖 cDNA を用いて抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体発現ベクターを作製し、NS0 細胞を形質転換し、抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回

の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として用いた。

## 2. 抗体の hIL-5R $\alpha$ に対する結合活性の測定 (ELISA 法)

抗体の hIL-5R $\alpha$  に対する結合活性は以下のようにして測定した。

W097/10354 に記載の抗 hIL-5R $\alpha$  マウス抗体 KM1257 を PBS で 10  $\mu$ g/ml の濃度に希釈した溶液の 50  $\mu$ l を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、4℃で 20 時間反応させた。反応後、1%BSA-PBS を 100  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、W097/10354 に記載の可溶性 hIL-5R $\alpha$  を 1%BSA-PBS で 0.5  $\mu$ g/ml の濃度に希釈した溶液を 50  $\mu$ l/ウェルで加え、4℃で 20 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型 CDR 移植抗体の各種希釈溶液を 50  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

## 3. 抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の精製

### (1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (1) で得られた抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/ml となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 8 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体は、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

### (2) CHO/dhfr-細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (2) で得られた抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 3mM、CDLC を 0.5%、PF68 を 0.3% の濃度で含む EX-CELL302 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/ml となるように懸濁し、4.0L スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 100rpm の速度で攪拌培養した。37℃の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体は、CHO/d-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

### (3) NS0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (3) で得られた抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを Yarranton らの方法 [BIO/TECHNOLOGY, 10, 169 (1992)] に従い、培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-

5R $\alpha$  CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体は、NSO-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

#### 4. 精製した抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の解析

上記実施例 3 の 3 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 3 種類の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の各 4 $\mu$ g を公知の方法 [Nature, 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量及び精製度を解析した。その結果を第 4 図に示した。第 4 図に示したように、精製した各抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] と一致し、各抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ、精製されたことが確認された。

#### 実施例 4. 抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の活性評価

##### 1. 抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の hIL-5R $\alpha$ に対する結合活性 (ELISA 法)

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の hIL-5R $\alpha$  に対する結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。第 5 図は、添加する抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第 5 図に示したように、3 種類の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体は、ほぼ同等の hIL-5R $\alpha$  に対する結合活性を示した。この結果は実施例 2 の 1 項の結果と同様に、抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。

##### 2. 抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の in vitro 細胞障害活性 (ADCC 活性)

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

##### (1) 標的細胞溶液の調製

W097/10354 に記載の hIL-5R $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖を発現しているマウス T 細胞株 CTLL-2(h5R) を RPMI1640-FBS(10) 培地で培養し、 $1 \times 10^6$  細胞/0.5ml となるように調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1.5 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

##### (2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Polymorphprep（Nycomed Pharma AS 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $9 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで（2）で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{l}$  ( $9 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 90:1 となる) 添加した。更に、各種抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を各最終濃度  $0.001 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$  となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は前記式 (II) により求めた。

その結果を第 6 図に示した。第 6 図に示したように、3 種類の抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体のうち、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体が最も高い ADCC 活性を示し、次いで CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、NS0-hIL-5RCDR 抗体の順に高い ADCC 活性を示した。以上の結果は実施例 2 の 2 項の結果と同様に、抗体の ADCC 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、2 種類のヒト化抗体のいずれの場合も YB2/0 細胞で生産した抗体が最も高い ADCC 活性を示したことから、YB2/0 細胞を用いることにより、ADCC 活性の高い抗体を製造できることが明らかとなった。

### 3. 抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の in vivo における活性評価

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の in vivo における活性を評価するため、以下に示す方法に従い、カニクイザルの hIL-5 誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を検討した。

カニクイザルに初日より hIL-5（調製方法は W097/10354 に記載）を  $1 \mu\text{g/kg}$  で 1 日 1 回、計 14 回背部皮下より投与した。各種抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を 0 日の hIL-5 の投与 1 時間前に  $0.3 \text{mg/kg}$  で静脈内に単回投与した。抗体非投与群をコントロールとして用いた。抗体投与群は各群 3 頭（No. 301、No. 302、No. 303、No. 401、No. 402、No. 403、No. 501、No. 502、No. 503）、抗体非投与群は 2 頭（No. 101、No. 102）のカニクイザルを用いた。投与開始の 7 日前より投与後 42 日目まで経時的に約 1ml の血液を伏在静脈または大腿静脈より採取し、 $1 \mu\text{l}$  の末梢血中の好酸球数を測定した。その結果を第 7 図に示した。第 7 図に示したように、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体を投与した群では、血中好酸球の増加が完全に抑制された。一方、CHO/d-hIL-5RCDR 抗体の投与群では、1 頭で完全な抑制作用が認められたものの、2 頭ではその抑制作用は不十分であった。NS0-hIL-5RCDR 抗体の投与群では、完全な抑制作用は認められず、その効果は不十分であった。

以上の結果は、抗体の in vivo 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体ではその in vivo 活性の高さは、実施例 4 の 2 項で述べた ADCC 活性の高さと正の相関が認められたことから、その活性発現には、ADCC 活性の高さが極めて重要であることが示唆された。

以上の結果から、ADCC 活性の高い抗体は、ヒトの各種疾患の臨床においても有用であることが期待される。

#### 実施例 5. ADCC 活性を高める糖鎖の解析

##### 1. 2-アミノピリジン標識糖鎖 (PA 化糖鎖) の調製

本発明のヒト化抗体を塩酸による酸加水分解にてシアル酸を除去した。塩酸を完全に除去した後、ヒドラジン分解により糖鎖をタンパク質から切断した [Method of Enzymology, 83, 263 (1982)]。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [J. Biochem., 95, 197 (1984)]。蛍光標識した糖鎖 (PA 化糖鎖) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて不純物と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖とした。

##### 2. 精製抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の PA 化糖鎖の逆相 HPLC 分析

上記実施例 5 の 1 項の方法で実施例 3 で作製された各種抗 hIL-5RCDR 抗体について PA 化糖鎖を行った後、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製) による逆相 HPLC 分析を行った。過剰量の  $\alpha$ -L-フコシダーゼ (ウシ腎由来、SIGMA 社製) を PA 化糖鎖に添加して消化を行い (37°C、15 時間)、逆相 HPLC で分析した (第 8 図)。アスパラギン結合糖鎖は 30 分間から 80 分間の範囲に溶出することを TaKaRa 社製 PA 化糖鎖スタンダードを用いて確認した。 $\alpha$ -L-フコシダーゼ消化によって、逆相 HPLC の溶出位置が移動する糖鎖 (48 分間から 78 分間に溶出される糖鎖) の全体に占める割合を計算した。結果を第 1 表に示す。

第 1 表

抗体の生産細胞	$\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖 (%)
YB2/0	47
NS0	73

YB2/0 細胞で生産させた抗 hIL-5RCDR 移植抗体は約 47%、NS0 細胞で生産させた抗 hIL-5RCDR 移植抗体は約 73%が N グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖 (以下、「 $\alpha$ -1,6-フコースを持つ糖鎖」とも表記する) であった。よって、YB2/0 細胞で生産した抗体は、NS0 細胞で生産した抗体と比較して N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースが結合していない糖鎖 (以下、単に、「 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖」と表記する) の割合が  $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖が多かった。

##### 3. 精製抗 hIL-5R $\alpha$ CDR 移植抗体の単糖組成分析

トリフルオロ酢酸による酸加水分解により、YB2/0 細胞、NS0 細胞および CHO/d 細胞で生

産した抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の糖鎖を単糖に分解し、BioLC (Dionex 社製) を用いて単糖組成分析を行った。

N-グリコシド結合糖鎖のうち、コンプレックス型では、1 本の糖鎖におけるマンノース数は 3 であるため、マンノースを 3 として計算した場合の各単糖の相対比を第 2 表に示す。

第 2 表

抗体の生産細胞	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	ADCC 活性 (%)*
YB2/0	0.60	4.98	0.30	3.00	42.27
NS0	1.06	3.94	0.66	3.00	16.22
CHO/dhfr-	0.85	3.59	0.49	3.00	25.73
CHO/dhfr-	0.91	3.80	0.27	3.00	25.73

\*抗体濃度 0.01  $\mu$ g/ml

フコースの相対比は、YB2/0 < CHO/d < NS0 であり、本結果でも YB2/0 細胞で生産した抗体の糖鎖はフコース含量が最も低かった。

#### 4. CHO/dhfr-細胞生産抗体の糖鎖解析

CHO/dhfr-細胞で生産した精製抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体から PA 化糖鎖を調製し、CLC-ODS カラム (島津社製) を用いて逆相 HPLC 分析を行った (第 9 図)。第 9 図において、溶出時間 35~45 分間がフコースを持たない糖鎖、45~60 分間がフコースを持つ糖鎖であった。CHO/dhfr-細胞で生産した抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体は、マウスミエローマ NS0 細胞で生産させた抗体と同様に、ラットミエローマ YB2/0 細胞で生産させた抗体よりもフコースを持たない糖鎖の含量が少なかった。

#### 実施例 6. 高 ADCC 活性抗体の分離

フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、ラットミエローマ YB2/0 細胞で生産させた抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体の分離を行った。HPLC は島津社製 LC-6A を用い、流速は 1ml/分、カラム温度は室温で行った。50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH7.3) で平衡化し、精製された抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を注入後、0.2M  $\alpha$ -メチルマンノシド (ナカライテスク社製) の直線濃度勾配 (60 分間) にて溶出した。抗 hIL-5R $\alpha$  CDR 移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分離した。非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R $\alpha$  に対する結合活性を測定すると、同様の結合活性を示した (10A 図)。ADCC 活性を測定すると、非吸着画分の方が吸着画分の一部よりも高い (100~1000 倍) ADCC 活性を示した (10B 図)。さらに、非吸着画分、吸着画分の一部から PA 化糖鎖を調製し、CLC-ODS カラム (島津社製) を用いて逆相 HPLC 分析を行った (第 11 図)。非吸着画分は主としてフコースのない糖鎖をもつ抗体であり、吸着画分の一部は主としてフコースがある糖鎖をもつ抗体であった。

#### 実施例 7. $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

##### 1. $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の調製

実施例 1 の 2 項 (1) に記載した方法に従って、抗 GD3 キメラ抗体を生産する YB2/0 細胞由来の形質転換クローンを得た。それぞれの YB2/0 細胞由来の形質転換クローンより抗体を



調製し、それぞれをロット1、ロット2、ロット3とした。抗GD3キメラ抗体ロット1、ロット2、ロット3の糖鎖分析を、実施例11の(6)の方法に従って行った結果、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ50%、45%、29%であった。以下、これらの試料を、抗GD3キメラ抗体(50%)、抗GD3キメラ抗体(45%)、抗GD3キメラ抗体(29%)と表記する。

また、実施例1の2項(2)で調製したCHO/DG44細胞由来の抗GD3キメラ抗体の糖鎖分析を実施例11の(6)の方法に従って行った結果、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、7%であった。以下、本試料を抗GD3キメラ抗体(7%)と表記する。

さらに、抗GD3キメラ抗体(45%)と抗GD3キメラ抗体(7%)を用い、抗GD3キメラ抗体(45%):抗GD3キメラ抗体(7%)=5:3および1:7の割合で混合した。これらの試料を、実施例10の(6)の方法に従って糖鎖分析を行った結果、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が24%および13%(分析値)の試料を調製した。これらを以下、抗GD3キメラ抗体(24%)、抗GD3キメラ抗体(13%)と表記する。

第12図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2回の糖鎖分析の結果を平均した値を用いた。

## 2. GD3に対する結合活性の評価(ELISA法)

実施例7の1項で調製した $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる6種類の抗GD3キメラ抗体のGD3(雪印乳業社製)に対する結合活性は、実施例1の3項に示すELISA法により測定した。その結果、第13図に示したように、6種類の抗GD3キメラ抗体は、いずれも同等のGD3に対する結合活性を示し、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

## 3. ヒトメラノーマ細胞株に対するADCC活性の評価

抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361(ATCC CRL1424)に対するADCC活性は、以下のようにして測定した。

### (1) 標的細胞溶液の調製

ヒトメラノーマ細胞株G-361の $1 \times 10^6$ 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37℃で1時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を5mL加え、 $2 \times 10^5$ 細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

### (2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血50mLを採取し、ヘパリンナトリウム(清水製薬社製)を0.5mLを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep(Axis Shield社製)を用いて使用説明書に従い、遠心分離(800g・20分間)して単核球層を分離した。培地で3回遠心分離(1200rpm・5分間)して洗浄後、培地を用いて $2 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の  $50\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (2) で調製したヒトエフェクター細胞溶液を  $100\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。さらに、抗 GD3 キメラ抗体を各最終濃度  $0.0005 \sim 5\mu\text{g/mL}$  となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、ヒトエフェクター細胞溶液の代わりに  $1\text{mol/L}$  の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。細胞障害活性 (%) は前記式 (II) により求めた。

第 14 図および第 15 図には、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の各種濃度 ( $0.0005 \sim 5\mu\text{g/mL}$ ) における ADCC 活性を 2 名の健常人ドナー (A、B) のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 14 図および第 15 図に示したように、抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性は、いずれの抗体濃度においても  $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が  $0.05\mu\text{g/mL}$  では、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖が 24%、29%、45% および 50% の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖が 20% 未満の抗体である、13% および 7% では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

### 実施例 8. $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の活性評価

#### 1. 抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

W001/64754 記載の抗 CCR4 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pKANTEX2160 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

##### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

$10\mu\text{g}$  の抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1662) ヘエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(5) [FBS (PAA ラボラトリーズ社製) を 5% 含む Hybridoma-SFM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に  $200\mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。 $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後、G418 を  $1\text{mg/mL}$  になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を  $1\text{mg/mL}$ 、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を  $50\text{nM}$  含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL に

なるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 1ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃ で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行い、得られたクローン化株を KM2760#58-35-16 と名付けた。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 の 4  $\mu$ g を  $1.6 \times 10^6$  細胞の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-dFBS(10)-HT(1) [dFBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 100  $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、IMDM-dFBS(10) (透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地) に培地交換し、1~2 週間培養した。HT 非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現したため、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTX を 50nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 0.5ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃ で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 200nM に上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は 5-03 株と名付けた。尚、実施例 9 に示す  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

## 2. 抗体 CCR4 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

抗 CCR4 キメラ抗体が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 25) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mg の BSA を含む PBS 溶液 900 mL に、100ml の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル]

(シグマ社製)-DMSO 溶液を vortex しながら滴下し、30 分間ゆっくりと撹拌した。25 mL PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1mL をアプライし、1.5mL の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした ( $A_{280}$  測定から BSA 濃度を算出)。次に、0.5 mg の化合物 1 に 250mL PBS を加え、次いで 250mL DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 換算 1.25mg) を vortex 下で添加して 3 時間ゆっくり撹拌した。反応液を PBS に対して 4°C、一晚透析し、最終濃度 0.05% となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22 mm フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液とした。

96 穴の EIA 用プレート (グライナー社) に、上述のように調製したコンジュゲートを  $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、4°C で一晚放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を  $100 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05%Tween20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 6000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG ( $\gamma$ ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5%SDS 溶液を  $50 \mu\text{L}$ /ウェル加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。実施例 8 の 1 項で得られた抗 CCR4 キメラ抗体は、CCR4 に対する結合活性を示した。

### 3. 抗 CCR4 キメラ抗体の精製

#### (1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例 8 の 1 項 (1) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローン KM2760#58-35-16 を 200nM MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製) を 5% の濃度で含む Hybridoma-SFM (インビトロジェン社製) 培地に  $2 \times 10^5$  細胞/ml となる様に懸濁し、スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 37°C の恒温室内で Fed-Batch 撹拌培養した。8-10 日間培養して回収した培養上清より、Prosep-A (ミリポア社製) カラム及びゲルろ過法を用いて、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体を KM2760-1 と名づけた。

#### (2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例 8 の 1 項 (2) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を生産する形質転換細胞株 5-03 株を IMDM-dFBS(10) 培地中で、 $182\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) にて 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25ml の PBS バッファーにて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を 35ml 注入した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体は KM3060 と名付けた。

KM2760-1 および KM3060 の CCR4 に対する結合活性を ELISA により測定した結果、同等の結合活性を示した。

#### 4. 精製した抗 CCR4 キメラ抗体の解析

本実施例 1 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の各 4  $\mu$ g を公知の方法 [Nature, 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量及び製精度を解析した。精製した各抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] と一致し、抗 CCR4 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

#### 5. $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の調製

実施例 8 の 3 項 (1) で調製した、YB2/0 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 と、実施例 8 の 3 項 (2) で調製した、CHO/DG44 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM3060 の糖鎖分析を、実施例 10 の (6) の方法に従って行った。 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、KM2760 は 87%、KM3060 は 8% であった。以下、これらの試料を、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) と表記する。

さらに、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%) と抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) を用い、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%): 抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) = 1:39、16:67、22:57、32:47、42:37 の割合で混合した。これらの試料を実施例 10 の (6) の方法にしたがって糖鎖分析を行なった。 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ 9%、18%、27%、39%、46% であった。以下、これらの試料を抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) と表記する。

第 16 図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2 回の結果を平均した値を用いた。

#### 6. CCR4 部分ペプチドに対する結合活性の評価 (ELISA 法)

実施例 8 の 5 項で調製した  $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性は実施例 8 の 2 に記載の方法に従って測定した。

その結果、第 17 図に示したように、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体は、いずれも同等の CCR4 に対する結合活性を示し、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

#### 7. ヒト CCR4 高発現細胞株に対する ADCC 活性の評価

抗 CCR4 キメラ抗体のヒト CCR4 高発現細胞である CCR4/EL-4 細胞 (W001/64754) に対する ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

### (1) 標的細胞溶液の調製

W001/64754 に記載のヒト CCR4 を発現している CCR4/EL-4 細胞の  $1.5 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 5.55MBq 当量加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間 30 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を 7.5mL 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

### (2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健康人末梢血 60mL を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を 0.6mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（AXIS SHIELD 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離（800g、20 分間）して単核球層を分離した。培地で 3 回遠心分離（1400rpm、5 分間）して洗浄後、培地を用いて  $5 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{L}$ （ $1 \times 10^4$  細胞/ウェル）を分注した。次いで上記（2）で調製したヒトエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{L}$ （ $5 \times 10^6$  細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 50:1 となる）添加した。さらに、抗 CCR4 キメラ抗体を各最終濃度  $0.0001 \sim 10 \mu\text{g/mL}$  となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに  $1\text{mol/L}$  の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性（%）は前記式（II）により求めた。

第 18 図および第 19 図には、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の各種濃度（ $0.001 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ ）における ADCC 活性を 2 名の健康人ドナー（A, B）のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 18 図および第 19 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性はいずれの抗体濃度においても  $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が  $0.01 \mu\text{g/mL}$  では、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖が 27%、39%および 46%の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖が 20%未満の抗体では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

### 実施例 9. 宿主細胞株における $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の転写物の定量

#### (1) 各種細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（dhfr）を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞およびラットミエローマ YB2/0 細胞より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製し

た。

CHO/DG44 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/ml の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。また、YB2/0 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製)、4mmol/l L-GLN (Life Technologies 社製) を添加した RPMI1640 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。これらを 37℃ の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞  $1 \times 10^7$  個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

全 RNA を 45  $\mu$ l の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1  $\mu$ l、付属の 10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5  $\mu$ l をそれぞれに添加して、37℃ で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA 3  $\mu$ g に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20  $\mu$ l の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。各宿主細胞由来  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (以下、FUT8 ともいう)、 $\beta$ -アクチンのクローニングには該反応液の 1 倍濃度液を、競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量には該反応液の 50 倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで -80℃ で保管した。

## (2) チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得

チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得は、以下の手順で行った (第 20 図)。

まず、ヒト FUT8 の cDNA [J. Biochem., 121, 626 (1997)] およびブタ FUT8 の cDNA [J. Biol. Chem., 271, 27810 (1996)] に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号 4 および配列番号 5 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (1) で調製した培養 2 日目の CHO 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA を各々 1  $\mu$ l を含む 25  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 4 および配列番号 5)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、94℃ で 1 分間の加熱の後、94℃ で 30 秒間、55℃ で 30 秒間、72℃ で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72℃ で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 979bp を GENECLAN Spin Kit (BIO 101 社製) を用いて精製し、滅菌水 10  $\mu$ l で溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片 4  $\mu$ l を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株をコーエンらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69,

2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法 [Nucleic Acids Research, 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる) に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー-377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 (配列番号 6 および 7 に示す) のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHFUT8-pCR2.1 および YBFUT8-pCR2.1 と称す。

### (3) チャイニーズハムスター $\beta$ -アクチンおよびラット $\beta$ -アクチン cDNA の取得

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの取得は、以下の手順で行った (第 21 図)。

まず、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンゲノム配列 (GenBank, U20114) およびラット  $\beta$ -アクチンゲノム配列 [Nucleic Acids Research, 11, 1759 (1983)] より、翻訳開始コードを含む共通配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号 8 に示す) および翻訳終止コードを含む各配列特異的なリバースプライマー (配列番号 9 および配列番号 10 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、本項 (1) で調製した培養 2 日目の CHO 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA  $1\mu\text{l}$  を含む  $25\mu\text{l}$  の反応液 [KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、 $0.2\text{mmol/l}$  dNTPs、 $1\text{mmol/l}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.4\mu\text{mol/l}$  上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 8 および 9、または配列番号 8 および 10)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、 $94^\circ\text{C}$  で 4 分間の加熱の後、 $98^\circ\text{C}$  で 15 秒間、 $65^\circ\text{C}$  で 2 秒間、 $74^\circ\text{C}$  で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1128bp を精製した。この DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い DNA 5' 末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水  $10\mu\text{l}$  に溶解した。

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+)  $3\mu\text{g}$  (Stratagene 社製) を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $35\mu\text{l}$  に溶解し、16 単位の制限酵素 EcoRV (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液に pH8.0 の  $1\text{mol/l}$  Tris-HCl 緩衝液  $35\mu\text{l}$  および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)  $3.5\mu\text{l}$  を添加して  $65^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水  $100\mu\text{l}$  に溶解した。

上記で得たチャイニーズハムスター cDNA 由来増幅断片およびラット cDNA 由来増幅断片 (1192bp)  $4\mu\text{l}$ 、プラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の EcoRV-EcoRV 断片 (約 3.0Kb)  $1\mu\text{l}$ 、



Ligation High (東洋紡績社製) 5  $\mu$ l を混合し、16℃で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHAc-pBS および YBac-pBS と称す。

#### (4) FUT8 スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内の FUT8 遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項 (2) で得たチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。FUT8 定量の内部コントロールとしては、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 のスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHFT8-pCR2.1 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8-pCR2.1 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37℃で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 各 cDNA 部分断片を含む EcoRI-EcoRI 断片 (約 1Kb) がプラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 より分離されたことを確認した。各反応液より、1  $\mu$ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 0.02fg/ $\mu$ l、0.2fg/ $\mu$ l、1fg/ $\mu$ l、2fg/ $\mu$ l、10fg/ $\mu$ l、20fg/ $\mu$ l、100fg/ $\mu$ l の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 のスタンダードとした。

チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールの調製は次のように行った (第 22 図)。DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 5ng を含む 25  $\mu$ l の反応液 [KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l MgCl<sub>2</sub>、0.4  $\mu$ mol/l 遺伝子特異的プライマー (配列番号 11 および 12)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、94℃で 4 分間の加熱の後、98℃で 15 秒間、65℃で 2 秒間、74℃で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 4.7Kb を精製した。該 DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い DNAs' 末端のリン酸化を

行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 50  $\mu$ l に溶解した。上記で得た DNA 断片 (約 4.7Kb) 5  $\mu$ l および Ligation High (東洋紡績社製) 5  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列 ScaI-HindIII 間 203bp が欠失したことを確認した。得られた各プラスミドを CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 と称す。

次にプラスミド CHFT8d-pCR2.1 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8d-pCR2.1 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 部分断片の内部塩基配列 203bp が欠失した断片を含む EcoRI-EcoRI 断片 (約 800bp) がプラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 より分離されたことを確認した。各反応液より、1  $\mu$ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 2fg/ $\mu$ l の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールとした。

#### (5) $\beta$ -アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内の  $\beta$ -アクチン遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項 (3) で得たチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBAc-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、各々切断し直鎖化した DNA を用いた。 $\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、CHAc-pBS および YBAc-pBS のうち、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAc-pBS および YBAc-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHAc-pBS 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBAc-pBS 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA ORF 全長を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.2Kb) がプラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS よ

り分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて  $2\text{pg}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{pg}/\mu\text{l}$ 、 $200\text{fg}/\mu\text{l}$ 、 $100\text{fg}/\mu\text{l}$ 、 $20\text{fg}/\mu\text{l}$  の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのスタンダードとした。

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った (第 23 図)。CHAc-pBS  $2\mu\text{g}$  を  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 3 (New England Biolabs 社製)  $100\mu\text{l}$  に溶解し、10 単位の制限酵素 DraIII (New England Biolabs) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った後、反応液を 2 等分した。まず一方の反応液には、 $\text{pH}8.0$  の  $1\text{mol}/\text{l}$  Tris-HCl 緩衝液  $35\mu\text{l}$  および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)  $3.5\mu\text{l}$  を添加し、 $65^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水  $10\mu\text{l}$  に溶解した。残る他方の反応液は  $0.8\%$  アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチン ORF 部分断片を含む約  $1.1\text{Kb}$  の DNA 断片を精製した。

上記で得た脱リン酸化 DraIII-DraIII 断片  $0.5\mu\text{l}$ 、約  $1.1\text{Kb}$  の DraIII-DraIII 断片  $4.5\mu\text{l}$ 、Ligation High (東洋紡績社製)  $5\mu\text{l}$  を混合し、 $16^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチン DraIII-DraIII 間  $180\text{bp}$  が欠失したことを確認した。本プラスミドを CHAc-pBS と称す。

また、ラット  $\beta$ -アクチン DraIII-DraIII 間  $180\text{bp}$  が欠失したプラスミドを CHAc-pBS と同様の工程を経て作製した。本プラスミドを YBAcd-pBS と称す。

次にプラスミド CHAc-pBS  $2\mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\mu\text{l}$  に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBAcd-pBS  $2\mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\mu\text{l}$  に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を  $0.8\%$  アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA ORF 全長の内部塩基配列  $180\text{bp}$  が欠失した断片を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約  $1.0\text{Kb}$ ) がプラスミド CHAc-pBS および YBAcd-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて  $200\text{fg}/\mu\text{l}$  の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールとした。

#### (6) 競合的 PCR による転写量の定量

本項 (4) で作製した FUT8 内部コントロール DNA および本項 (1) で得た宿主細胞株由来

cDNA を鋳型として競合的 PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の FUT8 の転写産物の定量値を算出した。一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各宿主細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を定量した。すなわち、本項 (5) で作製した  $\beta$ -アクチン内部コントロール DNA および本項 (1) で得た宿主細胞株由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の  $\beta$ -アクチンの転写産物の定量値を算出した。以下にその詳細を説明する。

FUT8 の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項 (2) で得たチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 ORF 部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット（配列番号 13 および 14 に示す）を設計した。

次に、本項 (1) で得た各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液  $5\mu\text{l}$  および内部コントロール用プラスミド  $5\mu\text{l}$  (10fg) を含む総体積  $20\mu\text{l}$  の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu\text{mol/l}$  上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 13 および 14）、5%DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、 $94^{\circ}\text{C}$  で 3 分間の加熱の後、 $94^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、 $60^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行なった。

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、本項 (4) で得た FUT8 スタンダードプラスミド  $5\mu\text{l}$  (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作製に用いた。

$\beta$ -アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項 (3) で得たチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン ORF 全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット（前者を配列番号 15 および配列番号 16 に、後者を配列番号 17 および配列番号 18 に示す）をそれぞれ設計した。

次に、本項 (1) で得られた各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液  $5\mu\text{l}$  および内部コントロール用プラスミド  $5\mu\text{l}$  (1pg) を含む総体積  $20\mu\text{l}$  の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu\text{mol/l}$  上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 15 および配列番号 16、または配列番号 17 および配列番号 18）、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行なった。PCR は、 $94^{\circ}\text{C}$  で 3 分間の加熱の後、 $94^{\circ}\text{C}$  で 30 秒間、 $65^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、本項 (5) で得た  $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド  $5\mu\text{l}$  (10pg、5pg、1pg、500fg、100fg) を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作製に用いた。

第 3 表

ターゲット 遺伝子	*プライマーセット	PCR増幅産物のサイズ (bp)	
		ターゲット	コンペティター
FUT8	F: 5' -GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3' R: 5' -CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3'	638	431
$\beta$ -actin (チャイニーズハムスター)	F: 5' -GATATCGCTGCGCTCGTTGTCGAC-3' R: 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGC-3'	789	609
$\beta$ -actin (ラット)	F: 5' -GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3' R: 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGC-3'	789	609

\*F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー

第 3 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 3 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 3 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、7  $\mu$ l を 1.75% アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を第 24 図に示した。培養期間を通じて CHO 細胞株は YB2/O 細胞株の 10 倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスター FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第 4 表に  $\beta$ -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。培養期間を通じて YB2/O 細胞株の FUT8 転写量が  $\beta$ -アクチンの 0.1% 前後であるのに対し、CHO 細胞株は 0.5%~2% であった。

以上の結果より、YB2/O 細胞株の FUT8 転写産物量は CHO 細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第 4 表

細胞株	培養日数				
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目
CHO	1.95	0.90	0.57	0.52	0.54
YB2/O	0.12	0.11	0.14	0.08	0.07

実施例 10. 抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体生産細胞株における  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の転写物の定量

(1) 各種生産細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体生産細胞 DCHI01-20 株および 61-33 株より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。DCHI01-20 株は、実施例 1 第 2 項 (2) 記載の CHO/DG44 細胞由来の形質転換クローンである。また 61-33 株は、YB2/0 由来の形質転換細胞 7-9-51 株 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

DCHI01-20 株を 3mmol/l L-GLN (Life Technologies 社製)、0.3% PLURONIC F-68 (Life Technologies 社製) および 0.5% 脂肪酸濃縮液 (Life Technologies 社製) を添加した EXCELL302 培地 (JRH BIOSCIENCES 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。また、61-33 株を 0.2% ウシ血清アルブミンフラクション V (Life Technologie 社製) (以下、BSA と略記する) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。これらを 37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞  $1 \times 10^7$  個を回収し、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

全 RNA を 45  $\mu$ l の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1  $\mu$ l、付属の 10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5  $\mu$ l をそれぞれに添加して、37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

得られた全 RNA 3  $\mu$ g に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20  $\mu$ l の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。該反応液を水で 50 倍希釈し、使用するまで -80°C で保管した。

(2) 競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量

本項 (1) で得た抗体生産細胞株由来 cDNA に対し、実施例 9 (6) に準じて競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量を行った。

各生産細胞株内の FUT8 遺伝子由来の mRNA 転写量の定量は、以下の手順で行った。

FUT8 転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

FUT8 定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (4) で調製した CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-

pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

本項 (1) で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$ l および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ l (10fg) を含む総体積 20  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l FUT8 遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、FUT8 スタンダードプラスミド 5  $\mu$ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1  $\mu$ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各生産細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

$\beta$ -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (3) で調製したチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBac-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

$\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (5) で調製した、CHAc-pBS および YBac-pBS のうちチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAc $\Delta$ -pBS および YBac $\Delta$ -pBS を、制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$ l および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ l (1pg) を含む総体積 20  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l  $\beta$ -アクチン特異的プライマー (配列番号 17 および 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、65°C で 1 分間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、 $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド 10pg、5pg、1pg、500fg、100fg を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1  $\mu$ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

第 3 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 3 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 3 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、7  $\mu$ l を 1.75% アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量

を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各生産細胞株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

第 5 表に  $\beta$ -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。培養期間を通じて、YB2/0 細胞由来抗体生産株 6I-33 の FUT8 転写量が  $\beta$ -アクチンの 0.3% 以下であるのに対し、CHO 細胞由来抗体生産株 DCHI01-20 は 0.7~1.5% であった。この結果より、YB2/0 細胞由来抗体生産株の FUT8 転写産物量は CHO 細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第 5 表

細胞株	培養日数				
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目
DCHI01-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
6I-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

#### 実施例 11. マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

##### (1) マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 発現プラスミドの構築

10%ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む IMDM 培地 (Life Technologie 社製) で継代培養したマウスミエローマ NS0 細胞 (理化学研究所セルバンク, RCB0213)  $1 \times 10^7$  個に対し、RNAeasy (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い全 RNA を抽出した。全 RNA を  $45 \mu\text{l}$  の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製)  $1 \mu\text{l}$ 、付属の  $10 \times$  DNase buffer  $5 \mu\text{l}$ 、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製)  $0.5 \mu\text{l}$  を添加して、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、 $50 \mu\text{l}$  の滅菌水に溶解した。得られた全 RNA のうち  $3 \mu\text{g}$  に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした  $20 \mu\text{l}$  の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。

マウス FUT8 cDNA の取得は以下の手順で行った (第 25 図)。

まず、マウス FUT8 の cDNA 配列 (GenBank, AB025198) より、翻訳開始コドンを含む配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号 19 に示す) および翻訳終止コドンを含む配列特異的なリバースプライマー (配列番号 20 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、前述の NS0 細胞由来 cDNA  $1 \mu\text{l}$  を含む  $25 \mu\text{l}$  の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2 \text{ mmol/l}$  dNTPs、4% DMSO、 $0.5 \mu\text{mol/l}$  上記特異的プライマー (配列番号 19 および配列番号 20)] を調製し、PCR を行った。PCR は、 $94^\circ\text{C}$  で 1 分間の加熱の後、 $94^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $72^\circ\text{C}$  で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに  $72^\circ\text{C}$  で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1728bp を精製した。この DNA 断片  $4 \mu\text{l}$  を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法に従って



各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、マウス FUT8 の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した (その DNA 配列を配列番号 2 に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号 24 に示す)。尚、本配列には、前述の GenBank 上に登録されたマウス FUT8 配列とはアミノ酸置換を伴う 3 塩基の不一致があった。以下、本プラスミドを mfFUT8-pCR2.1 と称す。

続いて、マウス FUT8 ORF 全長配列を含むプラスミド pBSmfFUT8 の構築を以下のように行った (第 26 図)。まず、プラスミド pBluescriptII KS(+) 1  $\mu$ g を (Stratagene 社製) を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35  $\mu$ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5  $\mu$ l を添加して 65°C で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10  $\mu$ l に溶解した。

一方、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 1  $\mu$ g を (Stratagene 社製) を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、マウス FUT8 cDNA ORF 全長を含む約 1.7Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の EcoRI-EcoRI 断片 (2.9Kb) 1  $\mu$ l、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 由来の EcoRI-EcoRI 断片 (1.7Kb) 4  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡績社製) 5  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pBSmfFUT8 と称す。

上記 pBSmfFUT8 および pAGE249 を用いて、マウス FUT8 発現ベクター pAGEmfFUT8 の構築を以下の手順で行った (第 27 図)。pAGE249 は、pAGE248 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] の誘導体であり、pAGE248 よりジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) 発現ユニットを含む SphI-SphI 断片 (2.7Kb) を除去したベクターである。

pAGE249 1  $\mu$ g を Universel Buffer H (宝酒造社製) 50  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35  $\mu$ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5  $\mu$ l を添加して 65°C で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10  $\mu$ l に溶解した。

一方、pBSmfFUT8 1  $\mu$ g を Universel Buffer H (宝酒造社製) 50  $\mu$ l に溶解し、20 単位の

制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃ で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃ で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、マウス FUT8 cDNA ORF 全長を含む約 1.7Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pAGE249 由来の BamHI-SalI 断片 (6.5Kb) 1  $\mu$ l、プラスミド pBSmfFUT8 由来の BamHI-SalI 断片 (1.7Kb) 4  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡績社製) 5  $\mu$ l を混合し、16℃ で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pAGEmfFUT8 と称す。

## (2) マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

本項 (1) で構築したマウス FUT8 発現ベクター pAGEmfFUT8 を 61-33 株へ導入し、FUT8 遺伝子の安定的発現株を取得した。上記 61-33 株は、抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体を高生産する YB2/0 細胞由来の形質転換細胞 7-9-51 株 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター, FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

プラスミド pAGEmfFUT8 の 61-33 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pAGEmfFUT8 30  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 600  $\mu$ l に溶解し、100 単位の制限酵素 FspI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃ で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しエタノール沈殿法を行い、回収した線状化プラスミドを 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 水溶液とした。次に、61-33 株を K-PBS 緩衝液 (137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.5mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4.0mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ) に懸濁して  $2 \times 10^7$  個/ml とし、細胞懸濁液 200  $\mu$ l ( $4 \times 10^6$  個) を上記線状化プラスミド 10  $\mu$ l (10  $\mu$ g) と混和した。細胞-DNA 混和液を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移した後、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 0.2KV、電気容量 250  $\mu$ F の条件で遺伝子導入を行った。この細胞懸濁液を 5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) 10ml に混和し、浮遊細胞用 96 穴プレート (Greiner 社製) に 100  $\mu$ l ずつ分注した。5%  $\text{CO}_2$ 、37℃ の条件下で 24 時間培養した後、培養上清 50  $\mu$ l を除去し、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) を 100  $\mu$ l ずつ分注した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 3 週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性を示す 14 株を取得した。

一方、pAGEmfFUT8 の母骨格ベクターであるプラスミド pAGE249 を 61-33 株へ導入することにより、ネガティブコントロール株を作製した。上述の手順で、制限酵素 FspI により線状化したプラスミド pAGE249 10  $\mu$ g をエレクトロポレーション法を用いて 61-33 株  $4 \times 10^6$  cells へ遺伝子導入した。該細胞を 5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) お

よび 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) 15ml に混和した後、浮遊細胞用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に移し入れ、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 24 時間培養した。培養後、800rpm で 4 分間の遠心分離を行い、上清の半量 (7.5ml) を除去した後、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2%BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) 7.5ml を添加して懸濁し、浮遊細胞用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に移し入れた。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 3 週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性株を取得した。

### (3) マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株における該遺伝子発現量の解析

本項 (2) で作製した 61-33 株由来マウス FUT8 過剰発現株 14 株より任意に選択した 6 株およびネガティブコントロール株に対し、競合的 RT-PCR を用いて FUT8 発現量の比較を行った。

上記過剰発現株を 0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、 $3 \times 10^5$  個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養した後、生細胞  $1 \times 10^7$  個を回収し、RNAeasy (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い全 RNA を抽出した。全 RNA を 45  $\mu$ l の滅菌水に溶解し、RQ1 Rnase-Free DNase (Promega 社製) 0.5U/ $\mu$ l、付属の 10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5  $\mu$ l を添加して 37℃で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

得られた全 RNA 2.5  $\mu$ g に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20  $\mu$ l の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。該反応液を水で 50 倍希釈し、実施例 9 (6) に準じて競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量に供した。

各発現株内の FUT8 遺伝子由来の mRNA 転写量の定量は、以下の手順で行った。

FUT8 転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (2) で調製したラット FUT8 の cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

FUT8 定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (4) で調製した YBFT8-pCR2.1 のうち、ラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各発現株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$ l および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ l (10fg) を含む総体積 20  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l ラット FUT8 遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5%

DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各発現株由来 cDNA に代えて、FUT8 スタンダードプラスミド 5  $\mu$ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1  $\mu$ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各発現株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

$\beta$ -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (3) で調製したラット  $\beta$ -アクチンの cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである YBac-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

$\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (5) で調製した YBac-pBS のうちラット  $\beta$ -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた YBac $\Delta$ -pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各発現株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$ l および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ l (1pg) を含む総体積 20  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l ラット  $\beta$ -アクチン特異的プライマー (配列番号 17 および 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、65℃で 1 分間、72℃で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。

また、各発現株由来 cDNA に代えて、 $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド 10pg、5pg、1pg、500fg、100fg を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1  $\mu$ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

第 3 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 3 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 3 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、7  $\mu$ l を 1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

第 28 図に  $\beta$ -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4 の 3 株および pAGE249 導入株は、FUT8 転写量が  $\beta$ -アクチン転写量の

0.3~10%であり、FUT8 転写量が比較的低い株であった。一方、mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7 の 3 株は、FUT8 転写量が  $\beta$ -アクチン転写量の 20~40%であり、FUT8 発現量が比較的高い株であった。

(4) マウス  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の精製

本項 (2) で得た FUT8 遺伝子過剰発現株 6 株およびネガティブコントロール株 1 株を、200nmol/l MTX、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T225 フラスコ (IWAKI 社製) 3 本に計 100ml 各々接種した。これらを 37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 7~9 日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティが同程度 (各々 30%以下) であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し 3000rpm、4°C の条件で 10 分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、4°C の条件で 1 時間の遠心分離を行った後、0.22  $\mu$ m 孔径 150ml 容 PES Filter Unit (NALGENE 社製) を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Prosep-A HighCapacity (bioPROCESSING 社製) を厚さ 2cm で充填し、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10ml および 1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 10ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清各 100ml をカラムに通筒し、1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 50ml で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5ml を用いて Prosep-A に吸着した抗体の溶出を行い、溶出液を 500  $\mu$ l ずつ分画すると共に、各分画をそれぞれ 2mol/l Tris-HCl (pH8.5) 100  $\mu$ l と混合して中和した。BCA 法 [Anal. Biochem., 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む 2 画分 (計 1.2ml) を選択して合一し、10mol/l クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて 4°C で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22  $\mu$ m 孔径 Millex GV (MILLIPORE 社製) を用いて滅菌濾過した。

(5) マウス  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の *in vitro* 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

本項 (4) で精製した抗 GD3 抗体の *in vitro* 細胞傷害活性を評価するため、GD3 陽性細胞であるヒトメラノーマ培養細胞株 G-361 [理化学研究所セルバンク, RCB0991] を用いて ADCC 活性を測定した。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む RPMI1640 培地 (Life Technologie 社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) で継代培養した G-361 細胞  $1 \times 10^6$  個を RPMI1640-FBS(10) 500  $\mu$ l に懸濁し、Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> 3.7MBq を添加して 37°C で 30 分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpm で 5 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞を RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で 30 分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁することにより、 $2 \times 10^6$  個/ml の標的細胞懸濁液を調製した。

一方、健康人の静脈血 30ml を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）0.5ml を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水（大塚製薬社製）30ml と混合した。混合後、各 10ml をそれぞれ Lymphoprep（NYCOMED PHARMA AS 社製）4ml 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球面分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30ml に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20ml に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて  $2 \times 10^6$  個/ml のエフェクター細胞懸濁液を調製した。

96 穴 U 字底プレート（Falcon 社製）の各穴に標的細胞懸濁液を  $50 \mu\text{l}$  ずつ ( $1 \times 10^4$  個/穴) 分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ ( $2 \times 10^5$  個/穴) 分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を 20:1 とした。次に 10M クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて、本項 (4) で得た各種抗 GD3 抗体より  $0.01 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$  の希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに  $50 \mu\text{l}$  添加することにより、終濃度  $0.0025 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.025 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g/ml}$  とした。5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 4 時間反応させた後、プレートに対し 1200rpm で 5 分の遠心分離を行った。各穴の上清  $50 \mu\text{l}$  を 12mm 径 RIA チューブ（IWAKI 社製）に分取し、MINAX-γ オートガンマカウンター 5550（PACKRD 社製）を用いて解離 <sup>51</sup>Cr 量の測定を行った。

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて RPMI1640-FBS(10)  $150 \mu\text{l}$  を添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離 <sup>51</sup>Cr 量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて 1 規定 塩酸  $100 \mu\text{l}$  および RPMI1640-FBS(10)  $50 \mu\text{l}$  を添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離 <sup>51</sup>Cr 量の値を求めた。これらの値を用いて実施例 2 の 2 項 (3) 記載の式 (II) により、ADCC 活性を求めた。

第 29 図に各種抗 GD3 抗体の G-361 細胞に対する ADCC 活性を示した。第 28 図において FUT8 発現量が低かった mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4 の 3 株は、ネガティブコントロールである pAGE249 株導入株と同等の高い ADCC 活性を示した。一方、第 28 図において FUT8 発現量が高かった mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7 の 3 株は、CHO 細胞より取得した抗 GD3 抗体と同等の低い ADCC 活性を示した。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 発現量を調節することにより、産生抗体の ADCC 活性を調節し得ることが示された。

#### (6) マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の糖鎖解析

本項 (4) で精製した抗 GD3 抗体の糖鎖解析を行った。mfFUT8-6、pAGE249 株導入株が産生する抗体のヒドラジン分解を行い、糖鎖をタンパク質から切断した [Method of Enzymology, 83, 263 (1982)]。減圧留去することによってヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [J. Biochem., 95, 197 (1984)]。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った (第 30 図)。ピーク面積から計算すると、mfFUT8-6 の  $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量は 10%、 $\alpha$ -1,6-フコー

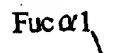
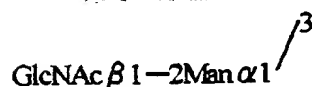
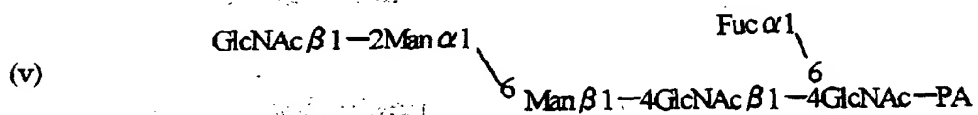
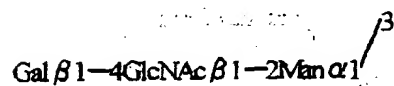
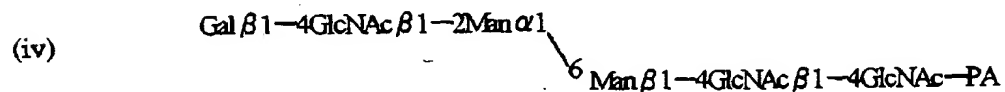
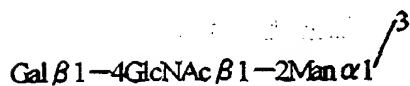
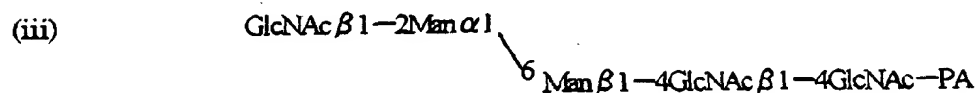
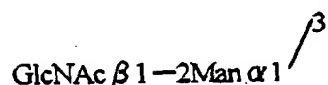
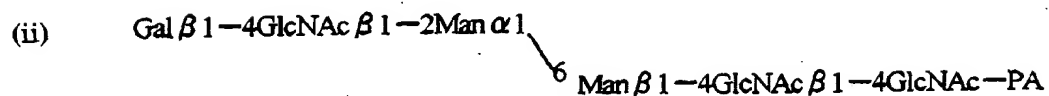
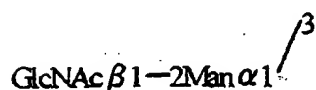
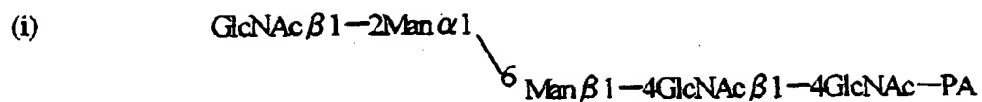
ス結合糖鎖含量は 90%であった。pAGE249 の  $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量は 20%、 $\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖含量は 80%であった。以上の結果から、FUT8 遺伝子を過剰発現させることにより、産生抗体の  $\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖含量が増加することがわかった。

第 30 図は、mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。第 30A 図に mfFUT8-6、第 30B 図に pAGE249 の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液 B としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) + 0.5%1-ブタノールを用い、以下のグラジエントで分析した。

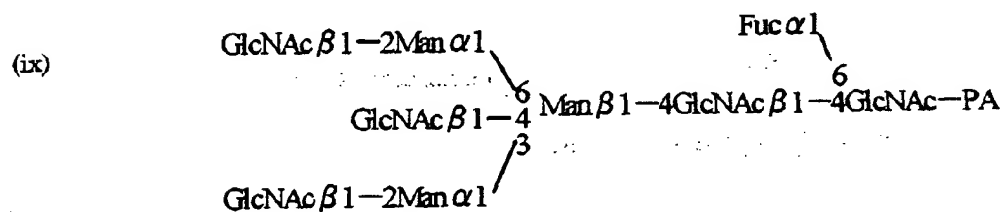
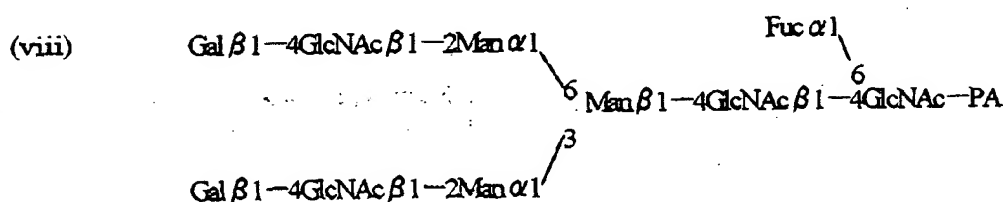
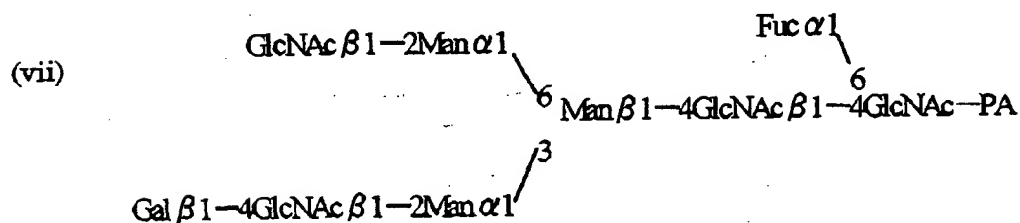
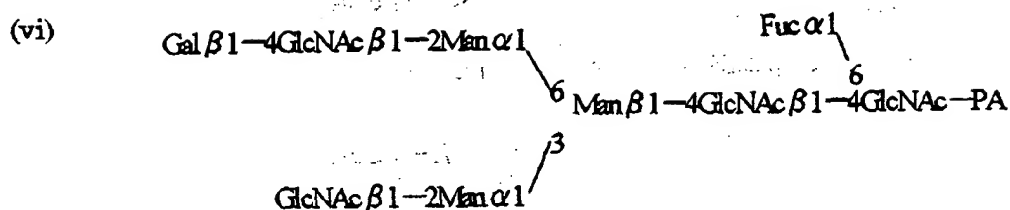
時間 (分)	0	80	90	90.1	120
緩衝液 B (%)	0	60	60	0	0

第 30 図と第 31 図で示した (i)~(ix) のピークは、以下の構造を示す。

09971773-100001  
FOOD E2712660







GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、Gal はガラクトース、Man はマンノース、Fuc はフコース、PA はピリジルアミノ基を示す。第 30 図と第 31 図において、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(i)~(ix)のうち (i)~(iv)のピークが占める面積、 $\alpha$ -1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(i)~(ix)のうち (v)~(ix)のピークが占める面積から算出した。

実施例 12. CHO 細胞  $\alpha$ -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の取得

(1) CHO 細胞  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) cDNA 配列の取得

実施例 9 (1) において培養 2 日目の CHO/DG44 細胞より調製した一本鎖 cDNA より、以下の手順でチャイニーズハムスター FUT8 cDNA を取得した (第 32 図)。

まず、マウス FUT8 の cDNA 配列 (GenBank, AB025198) より、5' 側非翻訳領域に特異的なフォワードプライマー (配列番号 21 に示す) および 3' 側非翻訳領域に特異的なリバースプライマー (配列番号 22 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、前述の CHO/DG44 細胞由来 cDNA 1  $\mu$ l を含む 25  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、4%DMSO、0.5  $\mu$ mol/l 上記特異的プライマー (配列番号 21 および配列番号 22)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 2Kb を精製した。この DNA 断片 4  $\mu$ l を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従ってプラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 8 クローンから、公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、全ての挿入 cDNA が、CHO 細胞 FUT8 の ORF 全長を含む配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、本プラスミドを CHfFUT8-pCR2.1 と称す。決定した CHO 細胞 FUT8 cDNA の塩基配列を配列番号 1 に示した。また、そのアミノ酸配列を配列番号 23 に示した。

## (2) CHO 細胞 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) ゲノム配列の取得

本項 (1) で取得した CHO 細胞 FUT8 ORF 全長 cDNA 断片をプローブとして用い、CHO-K1 細胞由来  $\lambda$ -ファージゲノムライブラリー (STRATEGENE 社製) よりモレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989) 等に記載の公知のゲノムスクリーニングの方法に従い CHO 細胞 FUT8 ゲノムクローンを取得した。次に、取得したゲノムクローンを各種制限酵素を用いて消化後、CHO 細胞 FUT8 cDNA の開始コドンを含む AfaI-Sau3AI 断片 (約 280bp) をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性を示した制限酵素断片のうち XbaI-XbaI 断片 (約 2.5Kb) および SacI-SacI 断片 (約 6.5Kb) を選択して pBluescriptII KS(+) (Strategene 社製) へ各々挿入した。

取得した各ゲノム断片の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、XbaI-XbaI 断片は CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含む上流イントロン約 2.5Kb の配列を、SacI-SacI 断片は CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含む下流イントロン約 6.5Kb の配列を各々コードすることを確認した。以下、XbaI-XbaI 断片を含むプラスミドを pFUT8fgE2-2、SacI-SacI 断片を含むプラスミドを pFUT8fgE2-4 と称す。決定した CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域の塩基配列 (約 9.0Kb) を配列番号 3 に示した。

実施例 13.  $\alpha$ -1,6-フコース転移酵素遺伝子を破壊した CHO 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

CHO 細胞  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン 2 を含むゲノム領域を欠失した CHO 細胞を作製し、該細胞が生産する抗体の ADCC 活性を評価した。

#### 1. チャイニーズハムスター $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクタープラスミド pKOFUT8Puro の構築

##### (1) プラスミド ploxPPuro の構築

以下の手順でプラスミド ploxPPuro を構築した (第 33 図)。

プラスミド pKOSelectPuro (Lexicon 社製) 1.0  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ピューロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、特開平 11-314512 に記載のプラスミド ploxP 1.0  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.0Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOSelectPuro 由来の AscI-AscI 断片 (約 1.5Kb) 4.5  $\mu$ l、プラスミド ploxP 由来の AscI-AscI 断片 (約 2.0Kb) 0.5  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、ploxPPuro と称す。

##### (2) プラスミド pKOFUT8gE2-1 の構築

実施例 12 (2) で得たチャイニーズハムスター FUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-2 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-1 を構築した (第 34 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-2 2.0  $\mu$ g を、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 SacI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド LITMUS28 (New England Biolabs 社製) 1.0  $\mu$ g を、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 SacI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100  $\mu$ g/ml BSA (New

England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.8Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 由来の EcoRV-SacI 断片 (約 1.5Kb) 4.5  $\mu$ l、プラスミド LITMUS28 由来の EcoRV-SacI 断片 (約 2.8Kb) 0.5  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-1 と称す。

### (3) プラスミド pKOFUT8gE2-2 の構築

本項 (2) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-1 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-2 を構築した (第 35 図)。

プラスミド pKOFUT8gE2-1 2.0  $\mu$ g を、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド ploxPPuro 1.0  $\mu$ g を、NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 HpaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOFUT8gE2-1 由来の EcoRV-KpnI 断片 (約 1.5Kb) 4.0  $\mu$ l、プラスミド ploxPPuro 由来の HpaI-KpnI 断片 (約 3.5Kb) 1.0  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-2 と称す。

### (4) プラスミド pscFUT8gE2-3 の構築

実施例 12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pscFUT8gE2-3 を構築した (第 36 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-4 2.0  $\mu$ g を NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HpaII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応

を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、Blunting High (東洋紡社製) を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った。フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行って DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド LITMUS39 (New England Biolabs 社製) 1.0  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.8Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-4 由来の HpaII-HindIII 断片 (約 3.5Kb) 4.0  $\mu$ l、プラスミド LITMUS39 由来の EcoRV-HindIII 断片 (約 2.8Kb) 1.0  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pscFUT8gE2-3 と称す。

#### (5) プラスミド pKOFUT8gE2-3 の構築

実施例 12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-3 を構築した (第 37 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-4 2.0  $\mu$ g を NEBuffer for EcoRI (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.8Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+) (Stratagene 社製) 1.0  $\mu$ g を NEBuffer for EcoRI (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.0Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-4 由来の HindIII-EcoRI 断片 (約 1.8Kb) 4.0  $\mu$ l、プラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の HindIII-EcoRI 断片 (約 3.0Kb) 1.0  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-3 と称す。

#### (6) プラスミド pKOFUT8gE2-4 の構築

本項 (4) および (5) で得たプラスミド pscFUT8gE2-3 および pKOFUT8gE2-3 を用いて、以

下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-4 を構築した (第 38 図)。

プラスミド pscFUT8gE2-3 1.0  $\mu$ g を、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.6Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-3 1.0  $\mu$ g を、100  $\mu$ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35  $\mu$ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5  $\mu$ l を添加し、65°C で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10  $\mu$ l に溶解した。

上記で得たプラスミド pscFUT8gE2-3 由来の SalI-HindIII 断片 (約 3.1Kb) 4.0  $\mu$ l、プラスミド pKOFUT8gE2-3 由来の SalI-HindIII 断片 (約 4.8Kb) 1.0  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-4 と称す。

#### (7) プラスミド pKOFUT8gE2-5 の構築

本項 (3) および (6) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 および pKOFUT8gE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-5 を構築した (第 39 図)。

プラスミド pKOFUT8gE2-2 1.0  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 SmaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 25°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 30  $\mu$ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0  $\mu$ l を添加し、65°C で 1 時間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10  $\mu$ l に溶解した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-4 1.0  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 SmaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 25°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2

(New England Biolabs 社製) 30  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 5.2Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 由来の SmaI-BamHI 断片 (約 5.0Kb) 0.5  $\mu$ l、プラスミド pKOFUT8gE2-4 由来の SmaI-BamHI 断片 (約 5.4Kb) 4.5  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 15 時間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-5 と称す。

#### (8) プラスミド pKOFUT8Puro の構築

本項 (7) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-5 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8Puro を構築した (第 40 図)。

プラスミド pKOSelectDT (Lexicon 社製) 1.0  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 50  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 RsrII (New England Biolabs 社製) 16 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ジフテリアトキシン発現ユニットを含む約 1.2Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-5 1.0  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 50  $\mu$ l に溶解し、制限酵素 RsrII (New England Biolabs 社製) 16 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 30  $\mu$ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0  $\mu$ l を添加し、65°C で 1 時間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10  $\mu$ l に溶解した。

上記で得たプラスミド pKOSelectDT 由来の RsrII-RsrII 断片 (約 1.2Kb) 1.0  $\mu$ l、プラスミド pKOFUT8gE2-5 由来の RsrII-RsrII 断片 (約 10.4Kb) 1.0  $\mu$ l、滅菌水 3.0  $\mu$ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0  $\mu$ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8Puro と称す。

## 2. $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン 2 を含むゲノム領域を 1 コピー破壊した CHO 細胞の作製

### (1) ターゲティングベクターの導入

本実施例第 1 項で構築したチャイニーズハムスター-FUT8 ゲノム領域ターゲティングベクター-pKOFUT8Puro を実施例 8 の 1(2) で作製した 5-03 株へ導入した。

プラスミド pKOFUT8Puro の 5-03 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pKOFUT8Puro 150  $\mu$ g を NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 1.8ml に溶解し、600 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 5 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノ

ール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  水溶液とした。一方、5-03 株を K-PBS 緩衝液 ( $137\text{mmol/l}$  KCl、 $2.7\text{mmol/l}$  NaCl、 $8.1\text{mmol/l}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.5\text{mmol/l}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $4.0\text{mmol/l}$   $\text{MgCl}_2$ ) に懸濁して  $8 \times 10^7$  個/ml とした。細胞懸濁液  $200\mu\text{l}$  ( $1.6 \times 10^6$  個) を上記線状化プラスミド  $4\mu\text{l}$  ( $4\mu\text{g}$ ) と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量  $250\mu\text{F}$  の条件で遺伝子導入を行った。同様にしてキュベット 30 本分に対し遺伝子導入した後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 30 枚へ播種した。 $5\%\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、 $15\mu\text{g/ml}$  Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を  $10\text{ml}$  ずつ分注した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性株を取得した。

## (2) ターゲティングベクター導入株の取得

本項 (1) で得たピューロマイシン耐性株より任意の 900 個のコロニーを以下の手順で採取した。

まず、ピューロマイシン耐性株が出現した 10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、 $15\mu\text{g/ml}$  Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地 (20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM) と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。レプリカプレートは、 $15\mu\text{g/ml}$  Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した。

## (3) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項 (2) で得た 900 クローンに対し、以下の手順でゲノム PCR による相同組換えの診断を行った。

まず、本項 (2) で作製したレプリカプレートより公知の方法 [Analytical Biochemistry, 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 ( $\text{pH}8.0$ ) ( $10\text{mmol/l}$  Tris-HCl、 $1\text{mmol/l}$  EDTA、 $200\mu\text{g/ml}$  RNase A)  $30\mu\text{l}$  に一晩溶解した。また、実施例 12. で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた



部分の配列に結合するプライマー（配列番号 26 に示す）およびベクター内の loxP 配列に結合するプライマー（配列番号 27 に示す）を設計した。

DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々 10  $\mu$ l 含む 25  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 26 および配列番号 27）] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は、94℃で 3 分間の加熱の後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした 38 サイクルの条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、CHO 細胞ゲノム領域とターゲットベクター相同領域との境界部を含む約 1.7Kb の特異的増幅が認められるものを陽性クローンとした。本法により陽性を示す 1 クローンを見出した。

#### (4) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項 (3) で陽性が確認された 1 クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断を行った。

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、本項 (3) で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 10 分間静置した。静置後、陽性クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート（Greiner 社製）へ播種した。15  $\mu$ g/ml Puromycin（SIGMA 社製）および 10% ウシ胎児透析血清（Life Technologies 社製）を添加した IMDM 培地（Life Technologies 社製）を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート（Greiner 社製）へ播種した。該プレートより公知の方法 [Nucleic Acids Research, 3, 2303 (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200  $\mu$ g/ml RNase A) 150  $\mu$ l に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12  $\mu$ g を NEBuffer 3（New England Biolabs 社製）120  $\mu$ l に溶解し、25 単位の制限酵素 PstI（New England Biolabs 社製）を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA) 20  $\mu$ l に溶解し、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3683 (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、実施例 12 で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲットベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー（配列番号 28 および配列番号 29）を設計した。次に、DNA ポリメラーゼ ExTaq（宝酒造社製）を用いて、実施例 12 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer（宝酒造社製）、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 28 および配列番号 29）] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られた

プローブ DNA 溶液 5  $\mu$ l に対し、[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5 $\times$ SSPE、50 $\times$ Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100  $\mu$ g/ml サケ精子 DNA] 15ml を加えて 65 $^{\circ}$ C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、 $^{32}$ P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65 $^{\circ}$ C で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80 $^{\circ}$ C で二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素 PstI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 4.4Kb の DNA 断片が生じる。一方、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 6.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、本項 (3) における陽性クローンのゲノム DNA より上記約 4.4Kb および約 6.0Kb の特異的断片が見出された。両断片の量比が 1:1 であったことから、本クローンは、FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊したクローンであることが確認された。本クローンを以下、1st.  $\Delta$ FUT8 2-46 株と称す。

### 3. $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子を 1 コピー破壊した CHO 細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

#### (1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例第 2 項で作製した 1st.  $\Delta$ FUT8 2-46 株へ、Cre リコンビナーゼ発現ベクター pBS185 (Life Technologies 社製) を導入した。

プラスミド pBS185 の 1st.  $\Delta$ FUT8 2-46 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、1st.  $\Delta$ FUT8 2-46 株を K-PBS 緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.5mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4.0mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ] に懸濁して  $8 \times 10^7$  個/ml とした。細胞懸濁液 200  $\mu$ l ( $1.6 \times 10^6$  個) をプラスミド pBS185 4  $\mu$ g と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250  $\mu$ F の条件で遺伝子導入を行った。導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) 10ml に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍希釈した。接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}$ C の条件下で 24 時間培養した。培養後、上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行った。

#### (2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項 (1) で得た株より任意の 400 個のコロニーを以下の手順で採取した。

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99

次に、レプリカプレートを  $15 \mu\text{g/ml}$  Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 6 日間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれたピューロマイシン耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、ピューロマイシン存在下で死滅する。本選抜法により 91 個の陽性クローンを見出した。

本項(2)で見出された陽性クローンのうち任意の6クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンブロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

上記で調製したゲノム DNA 12  $\mu$ g を NEBuffer for BamHI (New England Biolabs 社製) 120  $\mu$ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l EDTA) 20  $\mu$ l に溶解し、0.4% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3683 (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行った。

- 102 -

ライマー（配列番号 30 および配列番号 31）を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。PCR は、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5  $\mu$ l に対し、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 (5 $\times$ SSPE、50 $\times$ Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100  $\mu$ g/ml サケ精子 DNA) 15ml を加えて 65℃で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2 $\times$ SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80℃で二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素 BamHI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 19.0Kb の DNA 断片が生じる。また、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 12.5Kb の DNA 断片が生じる。さらに、相同組換えが起こった対立遺伝子からピューロマイシン耐性遺伝子（約 1.5Kb）が除去された場合には、同処理により約 11.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、上記 6 クローンのうち 5 クローンのゲノム DNA より上記約 19.0Kb および約 11.0Kb の特異的断片が見出された。両断片の量比が 1:1 であったことから、FUT8 ゲノム領域を 1 コピー破壊した株よりピューロマイシン耐性遺伝子が除去されたことが示された。本クローンを以下、1st.  $\Delta$ FUT8 2-46-1 株と称す。尚、上述の 1st.  $\Delta$ FUT8 2-46-1 株、1st.  $\Delta$ FUT8 2-46 株、及び、5-03 株のゲノムサザンの結果を第 41 図に示した。なお 1st.  $\Delta$ FUT8 2-46-1 株は 2-46-1 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6）に FERM BP-7755 として寄託されている。

#### 4. $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子破壊株が産生する抗体の精製

本実施例第 3 項で得た FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊した株 1st.  $\Delta$ FUT8 2-46-1 株を、 $3 \times 10^5$  個/ml の密度で 15  $\mu$ g/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) へ懸濁後、接着細胞培養用 T182 フラスコ (Greiner 社製) 2 本に計 60ml 各々播種した。3 日間の培養後、上清を除去し、EXCELL301 培地 (JRH Biosciences 社製) 計 60ml へ交換した。

これらを 37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 7 日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティが同程度（各々 30%以下）であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し 3000rpm、4℃の条件で 10 分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、4℃の条件で 1 時間の遠心分離を行った後、0.22  $\mu$ m 孔径 150ml 容 PES Filter Unit (NALGENE 社製) を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Prosep-A HighCapacity (bioPROCESSING 社製) を厚さ 2cm で充填し、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10ml および 1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 10ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清各 100ml をカラムに通塔し、1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 50ml で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5ml を用いて Prosep-A に吸着した抗体の溶出を行い、溶出液を 500  $\mu$ l ずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ 2mol/l Tris-HCl (pH8.5) 100  $\mu$ l と混合して中和した。BCA 法 [Anal. Biochem., 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む 2 画分 (計 1.2ml) を選択して合一し、10mol/l クエン酸-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH6.0) を用いて 4℃ で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22  $\mu$ m 孔径 Millex GV (MILLIPORE 社製) を用いて滅菌濾過した。

#### 5. $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子破壊株が産生する抗体の in vitro 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

本実施例第 4 項で精製した抗 CCR4 抗体の in vitro 細胞傷害活性を評価するため、実施例 8 に記載の CCR4 陽性細胞株 CCR4/EL-4 を用いた ADCC 活性を行った。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む RPMI1640 培地 (Life Technologie 社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) で継代培養した CCR4/EL-4 株  $1 \times 10^6$  個を RPMI1640-FBS(10) 500  $\mu$ l に懸濁し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  3.7MBq を添加して 37℃ で 90 分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpm で 5 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞を RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で 30 分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁することにより、 $2.0 \times 10^5$  個/ml の標的細胞懸濁液を調製した。

一方、健康人の静脈血 30ml を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5ml を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30ml と混合した。混合後、各 10ml をそれぞれ Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS 社製) 4ml 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30ml に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20ml に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて  $2.5 \times 10^6$  個/ml のエフェクター細胞懸濁液を調製した。

96 穴 U 字底プレート (Falcon 社製) の各穴に標的細胞懸濁液を 50  $\mu$ l ずつ ( $1 \times 10^4$  個/穴) 分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を 100  $\mu$ l ずつ ( $2.5 \times 10^5$  個/穴) 分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を 25:1 とした。次に RPMI1640-FBS(10) を用いて、本実施例第 5 項で得た各抗 CCR4 抗体より 0.01  $\mu$ g/ml、0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml の希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに 50  $\mu$ l 添加することにより、終濃度 0.0025  $\mu$ g/ml、0.025  $\mu$ g/ml、0.25  $\mu$ g/ml、2.5  $\mu$ g/ml とした。5%CO<sub>2</sub>、37℃ の条件下で 4 時間反応させた後、プレートに対し 1200rpm で 5 分の遠心分離を行った。各穴の上清 75  $\mu$ l を 12mm 径 RIA チューブ (IWAKI 社製) に分取し、MINAX- $\alpha$  オートガンマカウンタ-5550 (PACKRD 社製) を用いて解離  $^{51}\text{Cr}$  量の測定を行った。

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて RPMI1640-FBS(10) 150  $\mu$ l を添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて 1 規定 塩酸 100  $\mu$ l および RPMI1640-FBS(10) 50  $\mu$ l を添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離  $^{51}\text{Cr}$  量の値を求めた。これらの値を用いて前記式 (II) により、ADCC 活性を求めた。

第 42 図に各種抗 CCR4 抗体の ADCC 活性を示した。FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊した 1st.  $\Delta$ FUT8 2-46-1 株より得た抗体は、該遺伝子破壊前の CHO 細胞 5-03 株が産生する抗体に比べ有意に高い ADCC 活性を示した。また、これら抗体での抗原結合活性には変化は観察されなかった。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 対立遺伝子を破壊することにより、産生抗体の ADCC 活性を向上し得ることが確認された。

#### 実施例 14. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

##### (1) レクチン耐性 CHO/DG44 株の取得

CHO/DG44 細胞を、IMDM-FBS(10) 培地 [ウシ胎児血清 (FBS) を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度含む IMDM 培地] にて接着培養用フラスコ 75cm<sup>2</sup> (グライナー社製) 中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。5ml のダルベッコ PBS (インビトロジェン社製) にて細胞を洗浄後、ダルベッコ PBS で希釈した 0.05%トリプシン (インビトロジェン社製) を 1.5ml 添加して 37°C にて 5 分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、 $1 \times 10^5$  細胞/ml の密度になるように IMDM-FBS(10) 培地を添加して懸濁後、未添加又は 0.1  $\mu$ g/ml のアルキル化剤である N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (以下、MNNG と表記、Sigma 社製) を添加した。CO<sub>2</sub> インキュベータ (TABAI 製) 内で 37°C にて 3 日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、IMDM-FBS(10) 培地に懸濁後、接着培養用 96 穴プレート (岩城硝子社製) に 1000 細胞/ウェルの密度で播種した。各ウェルには培地中終濃度で 1mg/ml のレンズマメ凝集素 (Lens culinaris agglutinin; 以下、LCA と表記、Vector 社製)、あるいは 1mg/ml のヒロチャワンタケ凝集素 (Aleuria aurantia Lectin; 以下、AAL と表記、Vector 社製)、あるいは 1mg/ml のインゲンマメ凝集素 (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin; 以下、L-PHA と表記、Vector 社製) を添加した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 37°C にて 2 週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性 CHO/DG44 株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性 CHO/DG44 株については、LCA 耐性株を CHO-LCA 株、AAL 耐性株を CHO-AAL 株、L-PHA 耐性株を CHO-PHA 株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、CHO-LCA 株は AAL に対しても耐性であり、CHO-AAL 株は LCA に対しても耐性であることが分かった。さらに、CHO-LCA 株及び CHO-AAL 株は、LCA や AAL が認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミン残基の 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度 1mg/ml のエンドウマメ凝集素 (Pisum sativum Agglutinin; 以下、PSA と表記、Vector 社製) が添加された培地でも CHO-LCA 株及び CHO-AAL 株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤 MNNG 無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株

を取得することが可能であった。以後、それら株を解析に用いた。

## (2) 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞の作製

上記 (1) で得られた 3 種類のレクチン耐性株に、実施例 8 に記載した方法で、抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX2160 を導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は実施例 8 の 2 に記載した ELISA 法を用いて行い、CHO-LCA 株、CHO-AAL 株、CHO-PHA 株、それぞれから抗体を発現した形質転換株を取得した。取得したそれぞれの形質転換株については、CHO-LCA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-LCA 株、CHO-AAL 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-AAL 株、CHO-PHA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-PHA 株と名付けた。なお CHO/CCR4-LCA 株は Nega-13 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6）に FERM BP-7756 として寄託されている。

## (3) レクチン耐性 CHO 細胞による高 ADCC 活性抗体の生産

上記 (2) で得られた 3 種類の形質転換株を用い、実施例 8 の 3 に記載した方法で精製抗体を取得した。各抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の抗原結合活性は実施例 8 の 2 に記載した ELISA 法を用いて評価した。いずれの形質転換株が生産する抗体も、実施例 8 で作製した通常の CHO/DG44 細胞を宿主とした組換え細胞株 (5-03 株) が生産する抗体と同等の抗原結合活性を示した。それら精製抗体を用い、実施例 8 の 7 に記載した方法にしたがって各抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の ADCC 活性を評価した。その結果を図 43 に示した。5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株及び CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、約 100 倍程度の ADCC 活性の上昇が観察された。一方、CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体では有意な ADCC 活性の上昇は観察されなかった。また、CHO/CCR4-LCA 株と YB2/0 株が生産した抗体の ADCC 活性を実施例 8 の 7 に記載した方法にしたがって比較したところ、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体は実施例 8 の 1 で作製した YB2/0 細胞株が生産した抗体 KM2760-1 と同様に、5-03 株が生産した抗体に比べ高い ADCC 活性を示すことが明らかとなった (第 44 図)。

## (4) レクチン耐性 CHO 細胞が生産する抗体の糖鎖解析

上記 (3) で精製した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の糖鎖解析を行った。精製したそれぞれの抗体を、ウルトラフリー-0.5-10K (ミリポア社製) を用いて 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  に溶液を置換した。置換倍率は 80 倍以上になるように行なった。置換した抗体は、UV-1600 (品津社製) を用いて濃度を測定した。抗体のアミノ酸配列から式 (III) [Advances in Protein Chemistry, 12, 303 (1962)] を用いてモル吸光定数を算出し、280nm の吸光度 1.0 を 1.38mg/ml として濃度を決定した。

$$E_{280\text{nm}} = A \times n_1 + B \times n_2 + C \times n_3 \quad (\text{III})$$

$$E_{\text{mol/ml}} = E_{280\text{nm}} / \text{MW}$$

$E_{280\text{nm}}$ : 280nm での吸光係数 ( $\text{mg}^{-1} \text{ml cm}^{-1}$ )

$E_{\text{mol/ml}}$ : 280nm でのモル吸光係数 ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

A: トリプトファンの 280nm でのモル吸光係数 = 5550 ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

B: チロシンの 280nm でのモル吸光係数 = 1340 ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

C: シスチンの 280nm でのモル吸光係数 = 200 ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

n1: 抗体 1 分子あたりのトリプトファンの数

n2: 抗体 1 分子あたりのチロシンの数

n3: 抗体 1 分子あたりのシスチンの数

MW: 抗体の分子量 (g/mol)

100  $\mu$ g の抗体をヒドラクラブ S-204 用 Test tube に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固させた Test tube をホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行なった。ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110°C、1 時間反応させた [Method of Enzymology, 83, 263 (1982)]。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を 30 分間放置して室温に戻した。Test tube にホーネン社製アセチル化試薬の acetylation reagent を 250  $\mu$ l、無水酢酸を 25  $\mu$ l 入れてよく攪拌させ、室温で 30 分間反応させた。さらに acetylation reagent を 250  $\mu$ l、無水酢酸を 25  $\mu$ l 加えてよく攪拌させ、室温で 1 時間反応させた。試料を -80°C のフリーザーで凍結させ、約 17 時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、TaKaRa 社製セルロースカートリッジ グリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [J. Biochem., 95, 197 (1984)]。2-アミノピリジン溶液は 2-アミノピリジン 1g に対し HC1760  $\mu$ l を加え (1×PA 溶液)、その溶液を逆浸透精製水で 10 倍に希釈したものを用いた (10 倍希釈 PA 溶液)。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 10mg に対し 1×PA 溶液 20  $\mu$ l、逆浸透精製水 430  $\mu$ l を加えて調製した。試料に 10 倍希釈 PA 溶液を 67  $\mu$ l 入れて 100°C、15 分反応させ、放冷後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を 2  $\mu$ l 入れて 90°C、12 時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は 10mM 炭酸水素アンモニウム、流速は 0.5ml/分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。試料添加後 20 分から 30 分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製、 $\phi$ 6.0nm×150nm) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った。カラム温度は 55°C、流速は 1ml/ml、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) でカラムを平衡化し、0.5% 1-ブタノールの直線濃度勾配にて 80 分間溶出した。各 PA 化糖鎖の同定は、分取した各 PA 化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS 分析) におけるポストソース分解 (Post Source Decay) 分析、TaKaRa 社製 PA 化糖鎖スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各 PA 化糖鎖を消化後、逆相 HPLC 分析により行なった (第 45 図)。糖鎖含量は、逆相 HPLC 分析における各 PA 化糖鎖のピーク面積より算出した。還元末端が N-アセチルグルコサミンでない PA 化糖鎖は、不純物由来であるか、PA 化糖鎖調製中の副反応物であるため、ピーク面積の算出から除外した。

緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液 B としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) + 0.5% 1-ブタノールを用い、実施例 11 の (6) と同様に分析した。

第 45 図において、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(i)~(viii) のうち (i)



～(iv) のピークが占める面積、 $\alpha$ -1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(i)～(viii)のうち (v)～(viii) のピークが占める面積から算出した。

レクチン耐性株が生産する抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の糖鎖構造を分析した結果を第 6 表に示した。ここで、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の糖鎖を分析した結果を示したものである。実施例 d (4) に記載した方法で分析しピークの面積から計算した、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合 (%) を表に示す。

第 6 表

抗体の生産細胞	$\alpha$ -1,6-フコースを持たない複合二本鎖型糖鎖 (%)
5-03 株	9
CHO/CCR4-LCA 株	48
CHO/CCR4-AAL 株	27
CHO/CCR4-PHA 株	8

5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体では、分析ピークの面積から計算すると、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から 48%まで上昇していた。CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から 27%まで上昇していた。一方、PHA 耐性株では 5-03 株と比較して、糖鎖パターン及び  $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に殆ど変化は認められなかった。

#### 実施例 15. レクチン耐性 CHO 細胞株の解析

##### 1. 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA における GMD 酵素の発現量解析

実施例 14 で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA における、フコース生合成酵素として知られる GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)、GFPP (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase)、FX (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)、及びフコース転移酵素である FUT8 ( $\alpha$ -1,6-fucosyltransferase) の各遺伝子の発現量を、RT-PCR 法を用いて解析した。

##### (1) 各種細胞株からの RNA 調製

CHO/DG44 細胞、実施例 8 の 1(2) で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 5-03、実施例 14(2) で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA をそれぞれ 37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて継代後 4 日間培養した。培養後、RNeasy Protect Mini kit (キアゲン社製) を用いて、各  $1 \times 10^7$  細胞より添付の使用説明書に従って RNA を調製した。続いて、SUPER SCRIPT First-Strand synthesis system for RT-PCR (GIBCO BRL 社製) を用い、添付の使用説明書に従って各 RNA 5  $\mu$ g より 20  $\mu$ l の反応液中にて一本鎖 cDNA を合成した。

##### (2) RT-PCR 法を用いた GMD 遺伝子の発現量解析

GMD cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 17 の 1 で示す CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 32 で示される塩基配列を有する 24mer の合成 DNA プライマーと配列番号 33 で示される塩基配列を有する 26mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 32 と 33 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した後 94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、68 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 350bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (3) RT-PCR 法を用いた GFPP 遺伝子の発現量解析

GFPP cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 16 の 2 で取得した CHO 細胞由来 GFPP の cDNA 配列に基づいて、配列番号 34 で示される塩基配列を有する 27mer の合成 DNA プライマーと配列番号 35 で示される塩基配列を有する 23mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 34 と 35 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した後 94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、68 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 24 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (4) RT-PCR 法を用いた FX 遺伝子の発現量解析

FX cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 16 の 1 で取得した CHO 細胞由来 FX の cDNA 配列に基づいて、配列番号 36 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーと配列番号 37 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 36 と 37 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した後 94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、68 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 22 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 300bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (5) RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子の発現量解析

FUT8 cDNA を PCR 法によって増幅するために、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の

dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 13 と 14 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ l をアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (6) RT-PCR 法を用いた $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量解析

$\beta$ -アクチン cDNA を PCR 法によって増幅するために、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 15 と 16 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 14 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ l をアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 800bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (7) 各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT8 遺伝子の発現量

本項 (2) から (6) で測定した各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値を、各細胞株における  $\beta$ -アクチンの cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値で割り、CHO/DG44 細胞における PCR 増幅断片量を 1 とした場合の 5-03 株及び CHO/CCR4-LCA 株における各遺伝子の PCR 増幅断片量を求めた。結果を第 7 表に示す。

第 7 表

	GMD	GFPP	FX	FUT8
CHO/DG44 株	1	1	1	1
5-03 株	1.107	0.793	1.093	0.901
5-03 株由来 LCA 耐性細胞	0.160	0.886	0.920	0.875
CHO/CCR4-LCA				

第 7 表で示したように CHO/CCR4-LCA 株の GMD 遺伝子の発現量が他の細胞株と比べ 1/10 程度に低下していた。なお、本実験は独立して 2 回行い、その平均値を使用した。

## 2. GMD 遺伝子を強制発現させた抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA を用いた解析

### (1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD の構築

実施例 17 の 1 で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 38 で示さ

れる塩基配列を有する 28mer のプライマー、及び配列番号 39 で示される塩基配列を有する 29mer のプライマーを作製した。続いて、本実施例 1 項(1)で作製した CHO 細胞由来 GMD 一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 38 と 39 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱した後 94 $^{\circ}$ Cにて1分間、58 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを 8 サイクル反復した後、さらに 94 $^{\circ}$ Cにて1分間、68 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを 22 サイクル反復した。反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 600bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド mt-C を得た (第 46 図参照)。

次に、実施例 17 の 1 で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 40 で示される塩基配列を有する 45mer のプライマー、及び配列番号 41 で示される塩基配列を有する 31mer のプライマーを作製した。続いて、本実施例 1 項(1)で作製した CHO 細胞由来 GMD 一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 40 と 41 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱した後 94 $^{\circ}$ Cにて1分間、57 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを 8 サイクル反復した後、さらに 94 $^{\circ}$ Cにて1分間、68 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを 22 サイクル反復した。反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 150p の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ATG を得た (第 47 図参照)。

次に、実施例 17 の 1 で作製した 3  $\mu$ g のプラスミド CHO-GMD を制限酵素 SacI (宝酒造社製) で 37 $^{\circ}$ Cにて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37 $^{\circ}$ Cにて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画後、約 900bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。1.4  $\mu$ g のプラスミド mt-C を制限酵素 SacI (宝酒造社製) で 37 $^{\circ}$ Cにて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37 $^{\circ}$ Cにて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3.1kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) を得た (第 48 図参照)。

次に、2  $\mu$ g のプラスミド WT-N(-) を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で 37 $^{\circ}$ Cにて16時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37 $^{\circ}$ Cにて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1kbp

の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。3  $\mu$ g のプラスミド pBluescriptSK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) in pBS を得た (第 49 図参照)。

次に、2  $\mu$ g のプラスミド WT-N(-) in pBS を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2  $\mu$ g のプラスミド ATG を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT in pBS を得た (第 50 図参照)。

次に、2  $\mu$ g のプラスミド pAGE249 を制限酵素 HindIII と BamHI (共に宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 6.5kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2  $\mu$ g のプラスミド WT in pBS を制限酵素 HindIII と BamHI (共に宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1.2kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BIO101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド pAGE249GMD を得た (第 51 図参照)。

## (2) CHO/CCR4-LCA における GMD 遺伝子の安定発現

制限酵素 FspI (NEW ENGLAND BIOLABS 社製) で切断することにより直鎖状とした CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD を 5  $\mu$ g、 $1.6 \times 10^6$  細胞の CHO/CCR4-LCA 株へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、MTX (SIGMA 社製) を 200nM の濃度で含む 30ml の IMDM-dFBS(10) 培地を 10% 含む IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製) に懸濁し、182cm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) にて 37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml、MTX (SIGMA 社製) を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に培地交換してさらに 19 日間培養し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

また同様に、pAGE249 ベクターを上記と同じ方法で CHO/CCR4-LCA 株へ導入し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

### (3) GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の培養及び抗体の精製

本項 (2) で取得した GMD を発現している形質転換細胞群を MTX (SIGMA 社製) を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地を用いて、182cm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) にて 37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25ml の PBS バッファー (GIBCO BRL 社製) にて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を 35ml 注入した。37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。

また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群を上記と同じ方法で培養後、培養上清より抗 CCR4 キメラ抗体を回収、精製した。

### (4) 形質転換細胞群におけるレクチン耐性度の測定

本項 (2) で取得した GMD 遺伝子を発現している形質転換細胞群を、MTX (SIGMA 社製) を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に 6×10<sup>4</sup> 細胞/ml になるように懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 50 μl/ウェルずつ分注した。続いて、このウェルに MTX (SIGMA 社製) を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に 0mg/ml、0.4mg/ml、1.6mg/ml、4mg/ml の濃度で LCA (LENS CULINARIS AGGLUTININ; Vector Laboratories 社製) を懸濁した培地を 50 μl ずつ加え、37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 96 時間培養した。培養後、WST-I (ベリンガー社製) を 10 μl/ウェルになるよう加え、37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間放置して発色させたのち、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社製) にて 450nm と 595nm の吸光度 (以下 OD450、OD595 と表記する) を測定した。また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群も上記と同じ方法で測定した。以上の実験は独立して 2 回行なった。

上記で測定した OD450 から OD595 を引いた値を各細胞群の生存数とし、LCA を加えていないウェルの細胞生存数を 100%とした場合の各ウェルの細胞生存数を%で表記し第 52 図に示した。第 52 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株では LCA 耐性度の低下が観察され、0.2mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 40%程度、0.8mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 20%程度であった。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株では、0.2mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 100%、0.8mg/ml の LCA 存在下においても細胞生存率は 80%程度であった。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 LCA に対する耐性を獲得していることが示唆された。

### (5) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した抗 CCR4 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性 (ADCC 活性)

本項 (3) で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

#### i) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地に 500  $\mu$ g/ml の濃度で G418 硫酸塩 (ナカライテスク製) を添加した培地で培養した CCR4-EL4 株 (実施例 8 の 7 参照) の  $1 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 90 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、 $2.5 \times 10^5$  細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

#### ii) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $2 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

#### iii) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 1) で調製した標的細胞溶液の 50  $\mu$ l ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで 2) で調製したエフェクター細胞溶液を 100  $\mu$ l ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CCR4 キメラ抗体 (本項 (3) で精製した抗 CCR4 キメラ抗体、及び KM2760-1、KM3060) を最終濃度 0.0025~2.5  $\mu$ g/ml となるように加え、37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は前記式 (II) により求めた。

ADCC 活性測定の結果を第 53 図に示した。第 53 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、実施例 8 で取得した KM3060 と同程度にまで低下していた。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と同程度の ADCC 活性を有していた。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 ADCC 活性の高い抗体を生産出来ることが示唆された。

#### (6) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株由来の抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖解析

本項 (3) で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖解析を実施例 14 (4) に示す方法に従って行ない、その解析結果を第 55 図に示した。実施例 14 で作製した CHO/CCR4-LCA より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と比較して、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体では、分析ピークの面積から計算すると  $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 9% に低下していた。以上より、CHO/CCR4-LCA 株に GMD 遺伝子を発現させることによって、該細胞の生産する抗体の  $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 5-03

株の生産する抗体と同程度まで低下することが示された。

## 実施例 16. CHO 細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

### 1. CHO 細胞の FX cDNA 配列の決定

#### (1) CHO/DG44 細胞由来全 RNA の抽出

CHO/DG44 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/ml の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、培養 2 日目に  $1 \times 10^7$  個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

#### (2) CHO/DG44 細胞由来全一本鎖 cDNA の調製

上記 (1) で調製した全 RNA を 45  $\mu$ l の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1  $\mu$ l、付属の 10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5  $\mu$ l をそれぞれに添加して、37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50  $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA 3  $\mu$ l に対し SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20  $\mu$ l の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。GFPP および FX のクローニングには該反応液の 50 倍希釈水溶液を使用した。使用するまで -80°C で保管した。

#### (3) チャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒト FX の cDNA (Genebank 登録番号 U58766) およびマウスの cDNA (Genebank 登録番号 M30127) に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号 42 および配列番号 43 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (2) で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を 1  $\mu$ l を含む 25  $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 42 および配列番号 43)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は 94°C で 5 分間の加熱の後、94°C で 1 分、58°C で 2 分間、72°C で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 301bp を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20  $\mu$ l で溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片 4  $\mu$ l を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  をコーエンらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110



(1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、公知の方法 [Nucleic Acids Research, 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる) に従って、プラスミド DNA を単離し、FX cDNA 部分断片が組み込まれた 2 クローンを得た。各々 pCRFX クローン 8、pCRFX クローン 12 と称す。

FX クローン 8、FX クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの FX のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。

#### (4) RACE 用一本鎖 cDNA の合成

本項 (1) で抽出した CHO/DG44 全 RNA からの 5' および 3' RACE 用一本鎖 cDNA の作製を、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただし PowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖 cDNA は各々、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の鋳型として用いた。

#### (5) RACE 法によるチャイニーズハムスター FX 全長 cDNA の決定

上記 (3) 項で決定したチャイニーズハムスター FX の部分配列をもとにチャイニーズハムスター FX に特異的な 5' RACE 用プライマー FXGSP1-1 (配列番号 44) および FXGSP1-2 (配列番号 45)、チャイニーズハムスター FX 特異的な 3' RACE 用プライマー FXGSP2-1 (配列番号 46) および FXGSP2-2 (配列番号 47) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、本項 (4) で調製した CHO/DG44 由来 RACE 用一本鎖 cDNA を 1  $\mu$ l を含む 50  $\mu$ l の反応液 [Advantage 2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2mM dNTPs、0.2  $\mu$ mol/l チャイニーズハムスター FX 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCR は 94℃で 5 秒間、68℃で 10 秒間、72℃で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より 1  $\mu$ l をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 1  $\mu$ l をテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 8 表に示した。

第8表

チャイニーズハムスターFXcDNA RACE PCRに用いた  
プライマーの組み合わせとPCR産物の長さ

5' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP1-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	FXGSP1-2	NUP (Nested Universal primer)	300bp

3' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP2-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	FXGSP2-2	NUP (Nested Universal primer)	1100bp

PCR 後、反応液を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20 $\mu$ l で溶出した。上記増幅断片 4 $\mu$ l を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターFX の 5' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々を FX5' クローン 25、FX5' クローン 26、FX5' クローン 27、FX5' クローン 28、FX5' クローン 31、FX5' クローン 32 と称す。

同様にチャイニーズハムスターFX の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々 FX3' を FX3' クローン 1、FX3' クローン 3、FX3' クローン 6、FX3' クローン 8、FX3' クローン 9 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー-377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターFXcDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列 (配列番号 48) に示す。

## 2. CHO 細胞の GFPP cDNA 配列の決定

### (1) チャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒト GFPP の cDNA (Genebank 登録番号 AF017445)、該配列と相同性の高いマウス EST 配列 (Genebank 登録番号 AI467195、AA422658、BE304325、AI466474)、および Rat EST 配列 (Genebank 登録番号 BF546372、AI058400、AW144783) の塩基配列を比較し、3 種間で保存性の高い領域にラット GFPP に特異的なプライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 1 (2) で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を 1 $\mu$ l を含む 25 $\mu$ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5 $\mu$ mol/l 上記 GFPP 特異的プライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は 94 $^{\circ}$ C で 5 分間の加熱の後、94 $^{\circ}$ C で 1 分、58 $^{\circ}$ C で 2 分間、72 $^{\circ}$ C で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1.4Kbp を QiaexII

Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20  $\mu$ l で溶出した。上記増幅断片 4  $\mu$ l を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、GFPP cDNA 部分断片が組み込まれた 3 クローンを得た。各々 GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 と称す。

GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの GFPP のオープンリーディングフレーム (ORF) の部分配列をコードすることを確認した。

## (2) RACE 法によるチャイニーズハムスター GFPP 全長 cDNA の決定

本項 2 (1) で決定したチャイニーズハムスター FX の部分配列をもとにチャイニーズハムスター FX に特異的な 5' RACE 用プライマー GFPP GSP1-1 (配列番号 52) および GFPP GSP1-2 (配列番号 53)、チャイニーズハムスター GFPP 特異的な 3' RACE 用プライマー GFPP GSP2-1 (配列番号 54) および GFPP GSP2-2 (配列番号 55) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、本項 (4) で調製した CHO/DG44 由来 RACE 用一本鎖 cDNA 1  $\mu$ l を含む 50  $\mu$ l の反応液 [Advantage2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2mM dNTPs、0.2  $\mu$ mol/l チャイニーズハムスター GFPP 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCR は 94℃ で 5 秒間、68℃ で 10 秒間、72℃ で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より 1  $\mu$ l をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 1  $\mu$ l をテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 9 表に示した。

第 9 表

チャイニーズハムスター GFPP cDNA RACE PCR に用いた  
プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Universal primer)	1100bp
3' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM (Universal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP (Nested Universal primer)	1400bp

PCR 後、反応液を 1% アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20  $\mu$ l で溶出した。上記増幅

断片 4  $\mu$ l を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターGFPP の 5' 領域を含む cDNA4 クローンを得た。各々を GFPP5' クローン 1、GFPP5' クローン 2、GFPP5' クローン 3、GFPP5' クローン 4 と称す。

同様にチャイニーズハムスターGFPP の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々を GFPP3' クローン 10、GFPP3' クローン 16、GFPP3' クローン 20 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターGFPP cDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列 (配列番号 51) に示す。

## 実施例 17. CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の取得

### 1. CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列の決定

#### (1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の cDNA 取得 (5' 及び 3' 末端配列を除く部分 cDNA の取得)

GenBank に登録されているヒト GMD cDNA 配列 (GenBank Accession No. AF042377) をクエリーとして、げっ歯類由来 GMD cDNA を公的データベース (BLAST) を用いて検索した結果、3 種類のマウス EST 配列が得られた (GenBank Accession No. BE986856、BF158988、BE284785)。これら EST 配列を連結させることにより、推定されるマウス GMD cDNA 配列を決定した。

このマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 56 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、配列番号 57 で示される塩基配列を有する 27mer のプライマー、配列番号 58 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、配列番号 59 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、配列番号 60 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。

続いて、CHO 細胞由来 GMD cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 15 の 1 項 (1) で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の合成 DNA プライマー 2 種類] を調製した。なお、合成 DNA プライマーには配列番号 56 と配列番号 57、配列番号 58 と配列番号 57、配列番号 56 と配列番号 59、配列番号 56 と配列番号 60 の組み合わせを用いた。該反応液を DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて 94 $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した後、94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、68 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

この PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.2kbp、配列番号 57 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.1kbp、配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 350bp、配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1kbp の DNA 断片が増幅された。これら DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得

られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド 22-8（配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.2kbp の DNA 断片を有する）、23-3（配列番号 58 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.1kbp の DNA 断片を有する）、31-5（配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーから増幅された約 350bp の DNA 断片を有する）、34-2（配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1kbp の DNA 断片を有する）を得た。これらプラスミドに含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列を、DNA シークエンサーABI PRISM 377（パーキンエルマー社製）を用い、常法に従って決定した（5' 末端側の開始メチオニンより下流 28 塩基の配列、及び 3' 末端側の終了コドンより上流 27 塩基の配列は合成オリゴ DNA 配列由来のため、マウス GMD cDNA 配列である）。

さらに、プラスミド 22-8 と 34-2 に含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA を組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。1 $\mu$ g のプラスミド 22-8 を制限酵素 EcoRI（宝酒造社製）で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。2 $\mu$ g のプラスミド 34-2 を制限酵素 EcoRI で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド CHO-GMD を得た（第 54 図参照）。

## (2) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 5' 末端配列の決定

CHO 細胞由来ヒト及びマウス GMD cDNA の 5' 末端側 non-coding 領域の塩基配列より配列番号 61 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、及び CHO 由来 GMD cDNA 配列より配列番号 62 で示される塩基配列を有する 32mer のプライマーを作製し、cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 15 の 1 項 (1) で得られた CHO 細胞由来の一本鎖 cDNA 0.5 $\mu$ l を鋳型として含む 20 $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5 $\mu$ M の配列番号 61 と配列番号 62 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、55℃にて 1 分間、72℃にて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった後、さらに 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 18 サイクル行なった。該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 300bp の DNA 断片を Gene Clean II kit（BIO101 社製）を用い、添付の説明書に従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて pT7Blue(R) ベクター（Novagen 社製）に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド 5' GMD を得た。DNA シークエンサー377（パーキンエルマー社製）を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の開始メチオニンより下流 28 塩基の配列を決定した。

### (3) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 3' 末端配列の決定

CHO 細胞由来 GMD の 3' 末端 cDNA 配列を得るため、以下の方法で RACE 法を行なった。実施例 15 の 1 項 (1) で取得した CHO 細胞由来 RNA より、3' RACE 用一本鎖 cDNA の作製を SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素には PowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を用いた。調製後の一本鎖 cDNA は、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の鋳型として用いた。

続いて、上記 3' RACE 用一本鎖 cDNA 1  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 63 で示す 24mer の合成 DNA プライマー [本項 (1) で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より作製]、1 倍濃度の Universal Primer Mix (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属; CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液より 1  $\mu$ l を取り、Tricin-EDTA buffer (CLONTECH 社製) で 20 倍希釈した水溶液 1  $\mu$ l を鋳型として含む 20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 64 で示す 25mer の合成 DNA プライマー [本項 (1) で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より作製]、0.5  $\mu$ M の Nested Universal Primer (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属; CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 700bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 3' GMD を得た。DNA シークエンサー 377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の終止コドンより上流 27 塩基の配列、及び 3' 側の non-coding 領域 415bp の塩基配列を決定した。

以上、本項 (1)、(2)、(3) より決定した CHO 由来 GMD 遺伝子の全長 cDNA 配列を配列番号 65、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 71 に示す。

### 2. CHO/DG44 細胞の GMD 遺伝子を含むゲノム配列の決定

実施例 17 の 1 項で決定したマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 66 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、以下の方法で CHO 細胞由来ゲノム DNA を取得した。CHO/DG44 細胞由来 KC861 株を IMDM-dFBS(10)-HT(1) 培地 [HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地] に 3 $\times$ 10<sup>5</sup> 細胞/ml になるように懸濁し、接着細胞用平底 6 穴プレート (Greiner 社製) に 2ml/ウェルずつ分注した。37℃の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知

の方法 [Nucleic Acids Research, 3, 2303 (1976)] に従ってゲノム DNA を調製し、TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200  $\mu$ g/ml RNase A) 150  $\mu$ l に一晩溶解した。

上記で取得した CHO/DG44 細胞由来ゲノム DNA を 100ng、20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 59 と配列番号 66 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した後 94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、68 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 100bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex3 を得た。DNA シークエンサー 377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 67 に示した。

次に、実施例 17 の 1 項で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 68 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、及び配列番号 69 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、CHO/DG44 由来ゲノム DNA を 100ng、20  $\mu$ l の反応液 [1 $\times$ EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ M の配列番号 68 と配列番号 69 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94 $^{\circ}$ C にて 5 分間加熱した後、94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、68 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 200bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex4 を得た。DNA シークエンサー 377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 70 に示した。

#### 実施例 18. 市販抗体の糖鎖解析

CHO 細胞を宿主細胞にして産生させた市販抗 HER2/neu 抗体 Herceptin (GENENTECH 社、Roche 社製) の糖鎖解析を、実施例 10 の (6) の方法にしたがって行った (第 31 図)。ピーク面積から計算すると、Herceptin の  $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量は 16%、 $\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖含量は 84% であった。他の市販抗体に関しても同様の分析を行った結果、Rituxan (GENENTECH 社、Roche 社、IDEC 社製)、Zenapax (Roche 社、PDL 社製) では Herceptin よりも  $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量が少なかった。

第 31 図は、Herceptin から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相 HPLC の分析条件、糖鎖構造、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合の算出は実施例 11 の (6) と同じ方法で行った。

While the invention has been described in detail and with reference to specific embodiments thereof, it will be apparent to one skilled in the art that various changes and modifications can be made therein without departing from the spirit and scope thereof. All references cited herein are incorporated in their entirety.